DCode
ユニバーサルミューテーション検出システム
（カタログ番号 170-9080～170-9104）

操作取扱説明書
（DGGE/CDGE、TTGE、SSCP 法）

Ver. 2.2

詳細は英文取扱説明書をご参照下さい。

BIO-RAD

目　次

安全にお使いいただくために ……1

1．はじめに……2

2．DCodeシステムのコンポーネントとアクセサリー ……3

3．DGGE（Denaturing Gradient Gel Electrophoresis）法 ……7

4．DGGE：Perpendicular Gradient Gelの作製 ……9

5．DGGE : Parallel Gradient Gelの作製 ……17

6．CDGE : Constant Denaturant Gelの作製 ……20

7．TTGE（Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis)法 ……22

8．TTGE 泳動条件の決定法 ……23

9．TTGE : ゲルの作製 ……24

10．SSCP（Single-Strand Conformational Polymorphisms）法……26

11．SSCP :ゲルの作製 ……27

12．電気泳動準備について（DGGE,CDGE,TTGE,SSCP）法 ……27

13．電気泳動について ……30

14．ゲルの取り外し ……31

15．検出法について ……32

16．トラブルシューティング ……33

安全にお使いいただくために

1. 注意記号

DCodeシステムをご使用になる前に、取扱説明書をお読み下さい。技術的なお問い合わせは日本バイオ･ラッド ラボラトリーズあるいは米国バイオ･ラッド ラボラトリーズまでご連絡下さい。このシステムで用いるDC電源は別途お求め下さい。電源は必ずアースを接続してご使用になって下さい。弊社の電源装置は全て、安全性に対する配慮が行われており安全にご使用になれます。ご使用になる電源装置に関わらず、次の性能が出る機器をお使い下さい。：

- **最大電圧 500 VDC**
- **最大電力 50ワット**

システムの温度をコントロールするためのAC電流と、別途ご用意いただく電気泳動を行うためのDC電流は、温度コントロールモジュールを介して供給され安全に連動します。すなわち、温度コントロールモジュールを取り外すと泳動槽への電流の供給は遮断されます。

この安全システムを改造したり、変更したりしないで下さい。

温度コントロールモジュールを取り外したり、泳動槽を操作する場合には必ず、装置からACコードを、電源からはDCコードをぬいて下さい。

記号の意味

注意、電気ショックの恐れあり

注意

注意、表面高温

2. 設置する場合の注意事項

- **まわりで可燃性のものを使用しないで下さい。**
- **使用前にDCodeシステムの機器・部品が壊れていないことを確認して下さい。**
- **必ず水平の実験台の上でお使い下さい。**
- **温度コントロールモジュールはACとDC電源コードと共にバッファー槽の上に置いて下さい。**
- **ACとDCは正しく接続して下さい。**

3. 泳動中の注意事項

- **乾燥させた状態でポンプを稼動させないで下さい。泳動前にバッファーを冷却あるいは加熱する場合、必ず "Fill" 表示までバッファーを入れて下さい。；ただし、電気泳動中はバッファーの液面は "Max" 以下に保って下さい。**
- **すべての電源を抜く前に、装置の濡れた部分に触れないで下さい。**
- **DCode システムモジュールの上部には何も載せないで下さい。**

4. 泳動後の注意事項

- **必ず、主電源スイッチを切り、DCとAC電源のコードをぬいて下さい。ヒーターチューブは冷えてから泳動槽からはずして下さい。(約１分かかります)**
- **熱いセラミックチューブを冷たい液体につけないで下さい。**
- **温度コントロールモジュールは必ずアルミニウム製のDCode lid standに乗せて保管して下さい。**

（注）：使用後のヒーターチューブは熱いのでご注意下さい

1．はじめに

分子生物学の分野においてミューテーションを検出することは非常に重要な意味を持ちます。遺伝子の欠失、挿入、塩基置換等のスクリーニングにはサザンブロッティングが使用されていました。DNAのミューテーションを検出するために多くの手法が開発されてきました。これまで使用されてきた最も一般的な手法としてはSingle-Strand Conformational Polymorphism(SSCP), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Carbodiimide (CDI), Chemical Cleavage Of Mismatch (CCM), RNase Cleavage, Heteroduplex Analysis(HA), Protein Truncation Test (PTT)などがあげられます。また、比較的新しい手法としてTemporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE)があります。
バイオ・ラッドでは、DCodeシステムによってこれらの手法をより再現性良く、簡便に行なうことを可能にしました。

多くの研究室ではより効果的にミューテーションを検出するために複数の手法を組み合わせてミューテーション検出を行なっています。

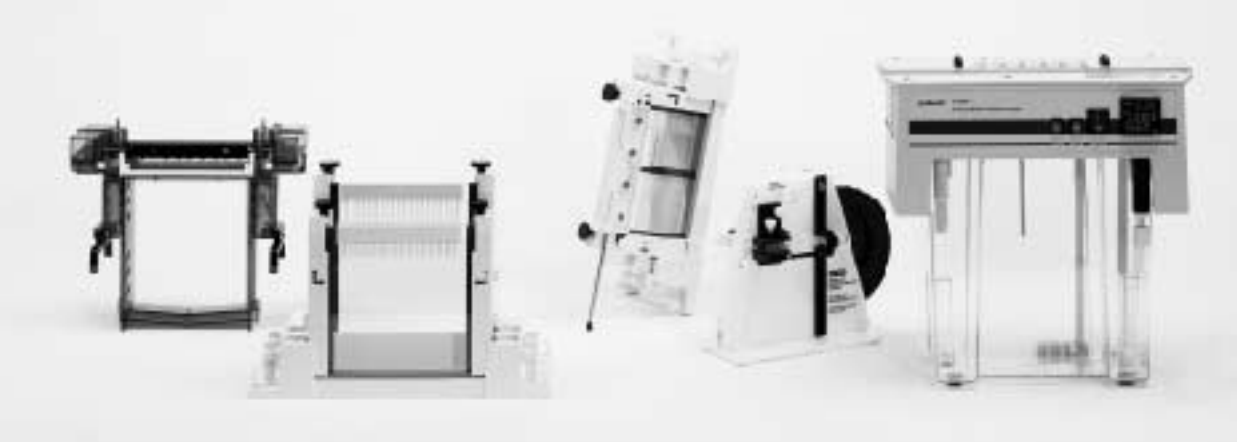
DCodeシステムは遺伝子のミューテーションを検出するための縦形の電気泳動装置です。
バッファーの攪拌と循環によって温度が均一に保たれ、温度コントローラーによって5-70℃での泳動が可能なためポリアクリルアミドゲルを用いた様々なミューテーション検出に対応できます。

◇ ソフトウェア

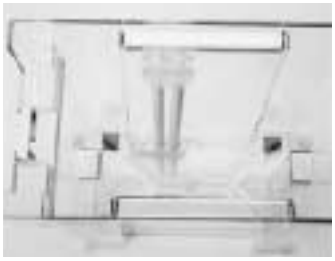
熱力学的に二本鎖DNAが一本鎖DNAに解離する変化は、Lermanらによって開発されたコンピュータープログラムによって知ることが可能です。このプログラムをバイオ・ラッドではソフトウェアとして提供しています。
これによってDNAの解離温度の算出とグラフ表示が可能です。得られたメルティングプロファイルから既知のDNA塩基配列のメルティングドメインを表示させることが可能です。
このソフトウェアは、泳動温度の決定や、変性剤濃度の算出をするものではなく、DNAの挙動をあらかじめ予想することによってプライマー、GCクランプの位置などを検討し、効果的な検出にお役立て頂くためのものです。

2. DCodeシステムのコンポーネントとアクセサリー

主な構成内容とその働き



1. 泳動槽



泳動槽は温度コントロールモジュールをした状態で安定した泳動が行われます。バッファー量は常に泳動槽に印刷された "Fill" と"Maximum"の間になるように入れて下さい。一回の泳動で使用するバッファーの量はおよそ7Lです。

2. 温度コントロールモジュール

温度コントロールモジュールはヒーター、バッファー循環ポンプ、撹拌棒などが付いたDCodeシステムの重要なモジュールです。

泳動槽に取り付けて泳動します。温度コントロールモジュールを取り付ける際はバッファータンクの底についている補助用の穴に温度コントロールモジュールから出ている撹拌棒の先が入るようにしてセットします。上部についているサンプルローディング用のフタはサンプルローディング中以外は必ず取り付けておいて下さい。

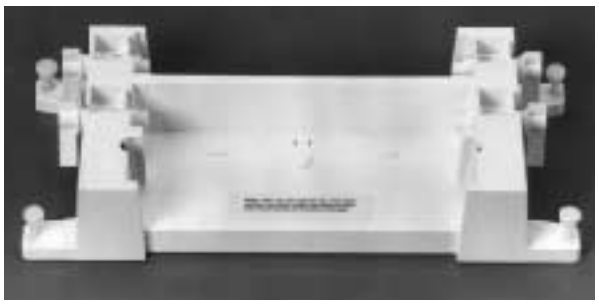
温度コントロールモジュール

3. コア

組み立てられたゲルサンドイッチをコアの両側に取り付けることによって上部バッファー槽を形成します。ガラスサンドイッチはコアについているガスケットに密着した状態にして漏れを防ぎます。また、コアには上部と下部のバッファーを循環させるための流路が作られています。

4. キャスティングスタンドとスポンジ

アクリルアミドの重合中、ゲルサンドイッチを垂直に保ちます。キャスティングスタンドはセルから独立しているため、泳動中に次のゲル作成に用いることが可能です。



5. サンドイッチクランプ

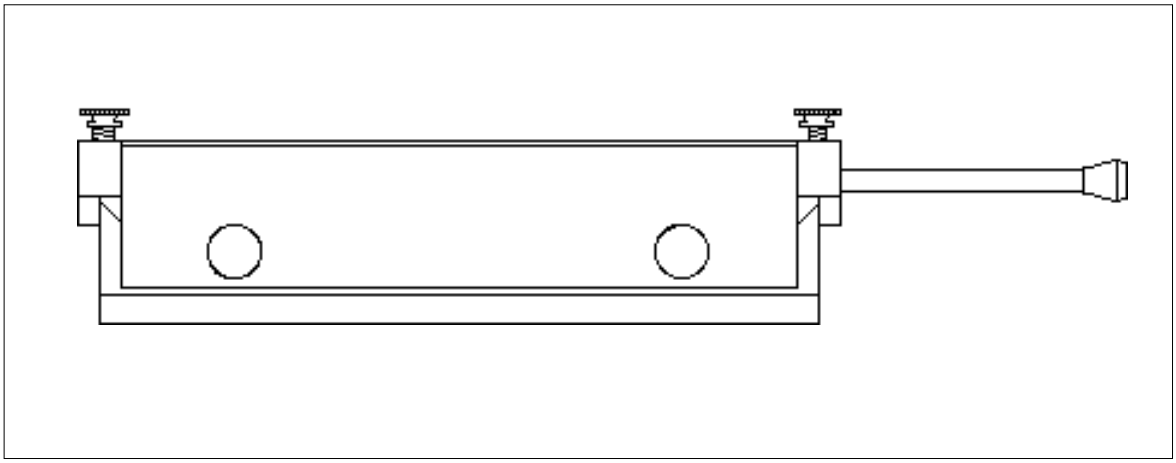
1つのネジでガラスサンドイッチを締め付けるサンドイッチクランプはバイオ・ラッドの特許であり、全体に均等に圧力がかかるように設計されています。サンドイッチクランプは左右１つずつからなり、それぞれ1.5mm厚（コーム、スペーサー）までセット可能です。

6. アライメントカード

ガラスサンドイッチを作成する際にスペーサーの位置を整えるために使用します。

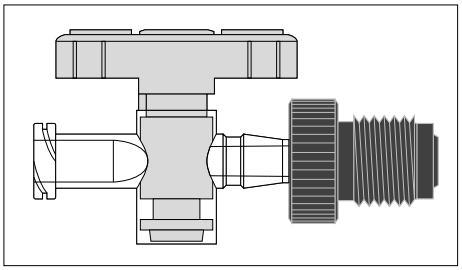
7. コームガスケット（DGGE専用）

コームガスケットは perpendicular グラジェントゲルを作成する際にガラスサンドイッチの上部をシーリングするために用います。ガラスサンドイッチのガラスの段差とコームガスケットが密着するように取り付けます。



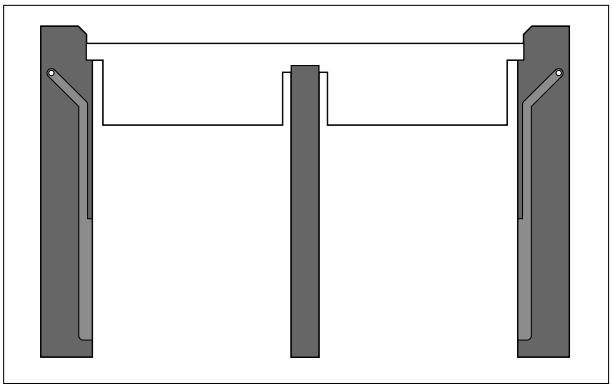
8. ストップコックとエアーベントプラグ

ストップコックとエアーベントプラグは垂直グラジェントゲルを作成する際に用います。ストップコックは図のようにインジェクションポートに差し込むにようにして使用します。エアーベントプラグはゲル作成後にゲルサンドイッチに取り付けられたコームガスケットに栓をするのに使用します。



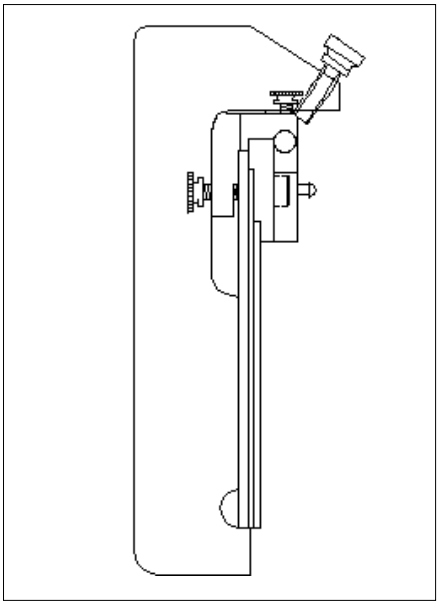
9. プレップコームとスペーサーセット

プレップコームとスペーサーセットはゲルに１つまたは２つのウェルを作成する際に用います。



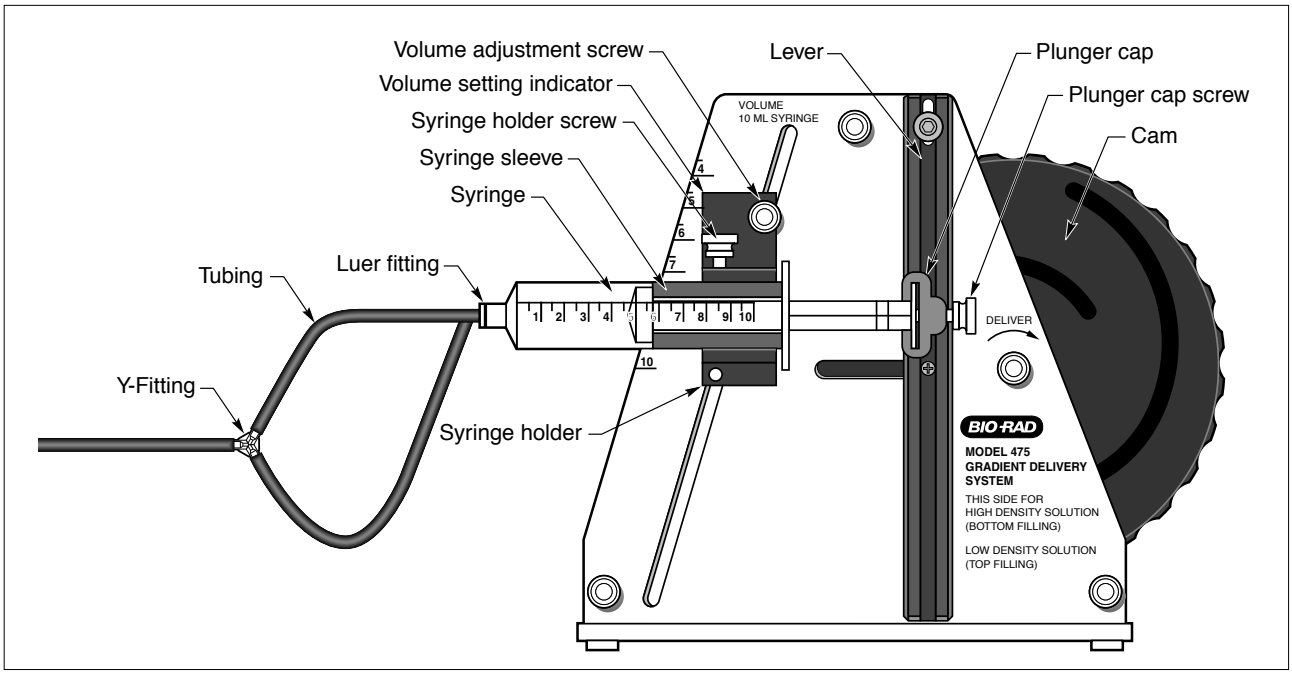
10. プレッシャークランプ

コームガスケットを均等な圧力で押さえ、密着をよくします。



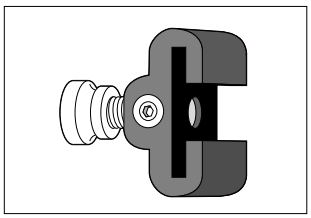
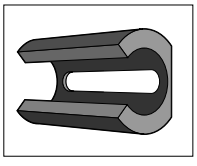
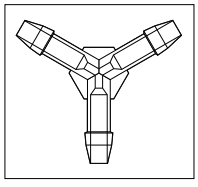
11. モデル475グラジェントフォーマー

モデル475グラジェントデリバリーシステムはカムを回すことによって簡単に再現性の良いグラジェントが作成できます。



その他のパーツ

1. シリンジ
   10mlと30mlのディスポーザブルシリンジが２組用意されています。10mlのシリンジはゲル容量が15ml以下のときに使用し、30mlのシリンジはそれ以上の時に使用します。正しいゲルを作成するために正しいサイズのシリンジを用いて下さい。
2. プランジャーキャップ／プランジャーキャップスクリュー
   ２つのプランジャーキャップが付いてきます。10mlおよび30mlのシリンジに取り付け可能です。プランジャーキャップのネジをゆるめ、シリンジのプランジャーヘッドに取り付けます。グラジェントデリバリーシステムのレバーに取り付けるにはプランジャーの中央に取り付けるようにします。
3. レバーアタッチメントスクリュー
   レバーアタッチメントスクリューはプランジャーキャップがついています。このネジはレバーに取り付けられ、そのレバーがカムによって動き、シリンジ中のゲル溶液を押し出します。ネジはしっかりとレバーの溝にはめ込みます。
4. シリンジスリーブ
   シリンジスリーブはそれぞれのサイズのシリンジ用に２組あります。シリンジの容量を示す目盛りが見えるようにシリンジを取り付けます。シリンジスリーブの背面または平らな部分がプランジャーキャップのレバーアタッチメントスクリューと同じ向きにします。
5. レバー
   レバーの位置はカムを回転させることによって調節します。使用する前は、必ずレバーをはじめの位置（垂直）に戻しておくことが重要です。
6. シリンジホルダー／シリンジホルダースクリュー
   シリンジホルダーはシリンジを取り付け、固定するものです。これでシリンジを固定し、レバーがプランジャーヘッドを押すことによってゲルが押し出されます。
7. ボリュームアジャストメントスクリュー
   ボリュームアジャストメントスクリューは、両側のシリンジホルダーのところについています。このネジをゆるめ、所定の位置にシリンジホルダーの位置を合わせて固定するときに使用します。
8. ボリュームセッティングインジケーター
   ボリュームセッティングインジケーターはシリンジホルダーの上端をその所定の容量に合わせるための目盛りです。この設定をするにはボリュームアジャストメントスクリューをゆるめ所定の位置にあわせてネジで固定します。
9. チュービング：タイゴン
   タイゴンチュービングが付属してきます。タイゴンチューブは、15.5cm２本と９cm１本とに切ります。長い方の２本のチューブはY-フィッティングとシリンジに取り付けられたルアーフィッティングの間につけ、短い９cmのチューブはY-フィッティングとストップコックバルブに取り付けるルアーカップリングに取り付けます。
10. Y-フィッティング
    Y-フィッティングは高変性剤濃度のゲルと低濃度ゲルを混合する時に用います。
11. ルアーフィッティング／カップリング
    ルアーフィッティングが２個付属しており、それらは10ml、30mlのどちらのシリンジにも取り付け可能です。
    ルアーフィッティングはシリンジに回して取り付け、その先にタイゴンチューブを取り付けます。
    ルアーカップリングは９cmのタイゴンの一端に取り付け、ゲルサンドイッチストップコックに取り付けます。

3．DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE：Denaturing Gradient Gel Electrophoresis）はDNA断片中の1塩基の違いを検出するための手法です。DGGE法による分離はFisherとLermanによって発表されました。変性剤濃度勾配ゲル中の変性剤濃度に応じて２本鎖DNAは“メルティングドメイン”ごとに解離していきます。これらの“メルティングドメイン”はそれぞれ解離温度（Tm値）を持ち、それらは塩基配列に依存しています。一番低いTm値を持ったメルティングドメインがその解離条件に達するとDNA鎖は部分解離します。部分解離したDNA鎖はポリアクリルアミドゲル中での移動度が非常に小さくなります。
Tm値はメルティングドメインの塩基配列に依存するため、この移動度の差を検出することによってmutantとwild typeの分離を行います。DNA鎖全体が完全に解離しますとDNAはサイズによって泳動されます。（Fig.2.1）
GCクランプと呼ばれる30-40bp程度の配列をサンプルに付加することによって高い検出効率が得られます。すなわち、GCクランプをPCRによってサンプルに付加すると、ターゲットとなるDNA部分がTm値の低いドメインとなり部分解離する差を検出可能となります。
（詳細は英文取扱説明書を参照して下さい）

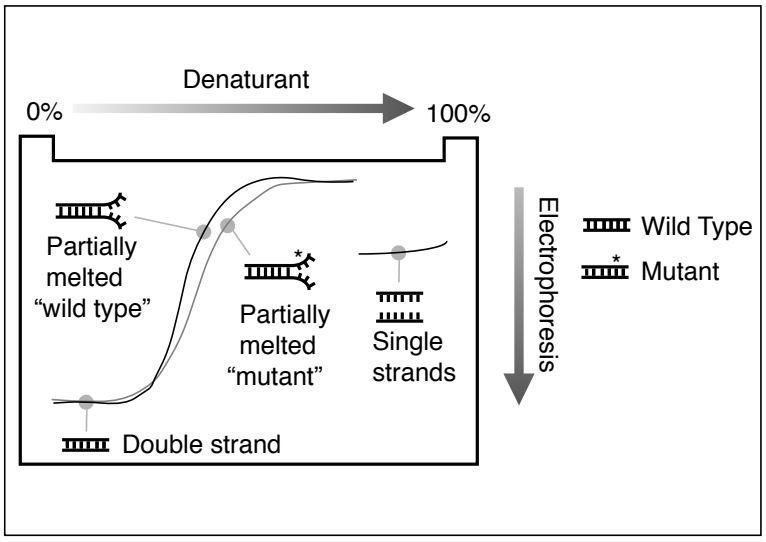


Fig. 3.1

DGGEは通常50-65℃の一定温度で泳動し、尿素とホルムアミドのリニア変性剤濃度勾配ゲルを使用します。7M尿素、40%ホルムアミドを100%変性ゲルとします。変性剤濃度勾配は泳動方向に対して垂直方向と平行方向に作製されます。垂直（perpendicular）ゲルを使用した場合、通常、0-100%または20-70%といったような範囲で変性剤濃度勾配が作製されます。平行DGGEでは変性剤濃度勾配は泳動方向に対して平行（parallel）に濃度勾配が作製され、変性剤の勾配範囲を狭くすることはより良い分離を得るために有効な手段です。

変性ゲルで泳動する際、mutantとwild typeのDNAは同じゲルにアプライされます。このようにしてmutantとwild typeのDNAは移動度の違いが検出されます。
mutantとwild typeのDNAの通常、バンドの検出を助けるためにPCRによって増幅して用います。
最適な分離が得られるのはDNA鎖が部分的に解離した状態、即ちもっとも低いドメインのみが解離しており、そのドメイン中にmutationがある場合です。

◇ 試薬の調製

DCodeシステムでは解析するサンプルに応じてゲルのアクリルアミド濃度、変性剤濃度を変化させることが可能です。アクリルアミド濃度は解析するDNAのサイズによって変化させます。変性剤濃度範囲は0－100%や20－70%といった範囲が一般的です。まず変性剤濃度 0%と100%のゲルを作製します。変性剤濃度100%ゲルは7M 尿素と40%ホルムアミドです。DGGE法で必要なすべての試薬はキットとして販売しています。
（カタログ番号170-9150： DCode Electrophoresis Reagent Kit for DGGE/CDGE）
試薬の調製の詳細については英文取扱説明書を参照して下さい。

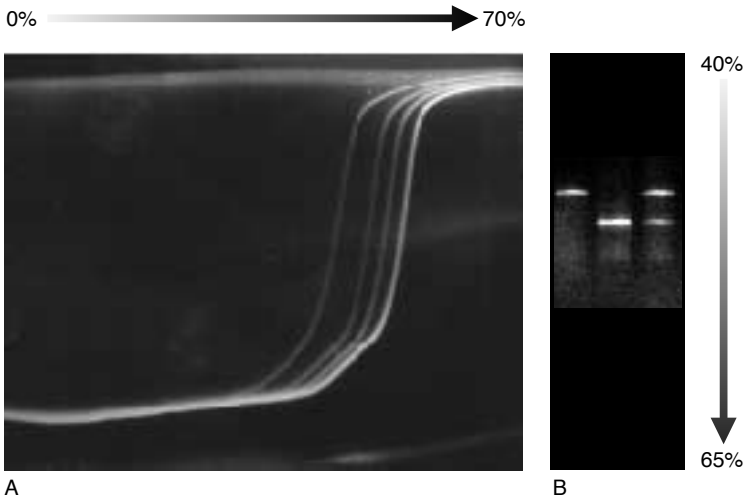
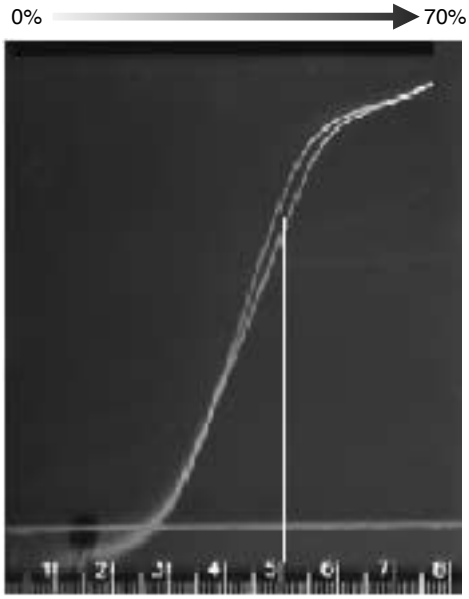


Fig.3.2 A.Perpendicular denaturing gradient gel in which the denaturing gradient is perpendicular to the electrophoresis direction. Mutant and wild-type alleles of exon 6 from the TP53 gene amplified from primary breast carcinomas and separated by perpendicular DGGE(0-70% denaturant) run at 80 V for 2 hours at 56 C.The first two bands on the left are heteroduplexes and the other two bands are the homoduplexes.
B.Parallel denaturing gradient gel in which the denaturing gradient is parallel to the electrophoresis direction. Mutant and wild-type alleles of exon 8 from the p53 gene separated by an 8% acrylamide:bis (37.5:1) gel with a parallel gradient of 40-65% denaturant. The gel was run at 150 V for 2.5 hours at 60 C in 1x TAE buffer. Lane 1 contains the mutant fragment, lane 2 contains the wild-type fragment, lane 3 contains both the mutant and wild-type fragments.

◇ DGGEとCDGEについて

CDGEの濃度は垂直DGGE等でwild typeとmutantとの移動度の差が顕著に見られる変性剤濃度を決定し、その変性剤濃度の均一ゲルを用います。



20-70%のperpendicular gradient gelにて泳動をし、バンドの解離している濃度を決定します。

決定された変性剤濃度の均一ゲルにて泳動することによって wild typeとmutantの分離が可能となります。このように均一ゲルによる多検体のスクリーニングができます。

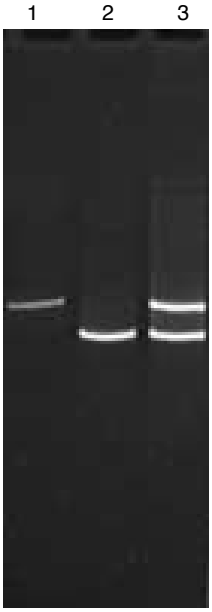


Fig.3.3 Example of perpendicular DGGE gel used for determining the optimum denaturan concentration used in a CDGE gel. The distance along the gradient where the maximum split seen between samples is 5cm.The denaturant concentration of the gragient at this distance is 51%. Therefore, the CDGE gel should use a denaturant concentration of 51%.

Fig.3.4 Constant denaturing gel. Amplified mutant and wild-type alleles of exon 8 from the p53 gene. Separation by CDGE run at 130 V for 2.5 hours on a 10% acrylamide gel in 51% denaturant at 56 C. Lane 1, mutant allele; lane 2, wild-type allele;lane 3, mutant and wild-type allele.

4．DGGE/Perpendicular Gradient Gelの作製

ここでは、10cmガラスプレートに2ウェルコームを用いて2枚の7.5×10cm Perpendicular gradient gelを作製する手順について記します。

注意：ガラスプレートサンドイッチを作製する際は、手袋と安全眼鏡を着用して下さい。

1. バッファー槽の中のインナーコアは取り出しておきます。7Lの1×TAEを用意し、DCodeチャンバーの“Fill”と“Run”level lineの間に水面がくるように満たします。 DCodeの温度コントロールモジュールをセットし、電源を入れヒーターとポンプのスイッチをいれます。ヒーターの温度コントローラーの設定を60℃（注）にします。℃/RR の表示のあるボタンを押し、200 ℃に設定すると急速に設定温度まで加温し、時間の短縮が可能です。
（温まるまで1～1.5 時間かかります。泳動槽にて加温する前に電子レンジにて予め温めておくことも可能です。）
再現性の良い泳動を行うためにバッファーの再利用はおすすめ致しません。

（注）：実際の泳動温度より少し高めにセットしておきます。

2. きれいに洗浄し乾燥させたガラス板、スペーサーを組み立てます。長いガラス板を置き、その上の両端にスペーサーをセットします。スペーサーは、切り込みのついている方を内側にします。彫り込みのある面を長い方のガラスプレートにつけるように乗せます。その上に短いガラス板をのせ、下端を揃えます。（Fig.4.1）

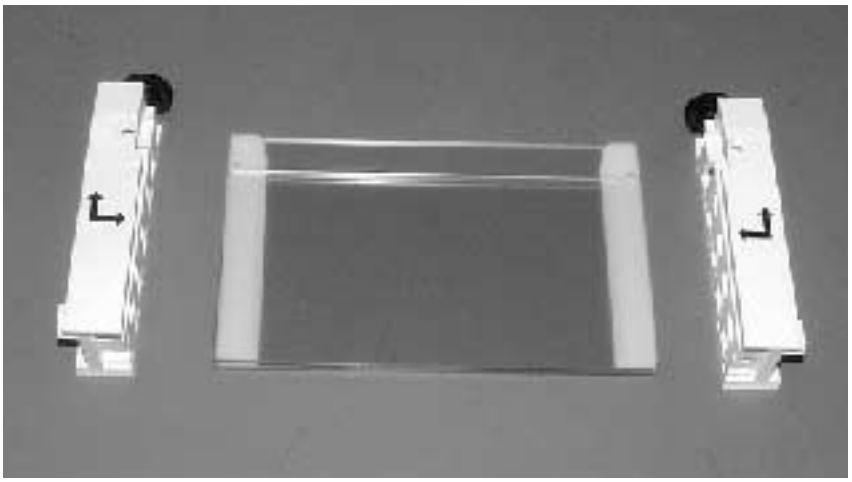


Fig. 4.1

3. 左右のサンドイッチクランプを取り付け、軽くしめます。軽く締めた状態でキャスティングスタンドの固定用カムの無いスロットにセットします。（Fig.4.2）

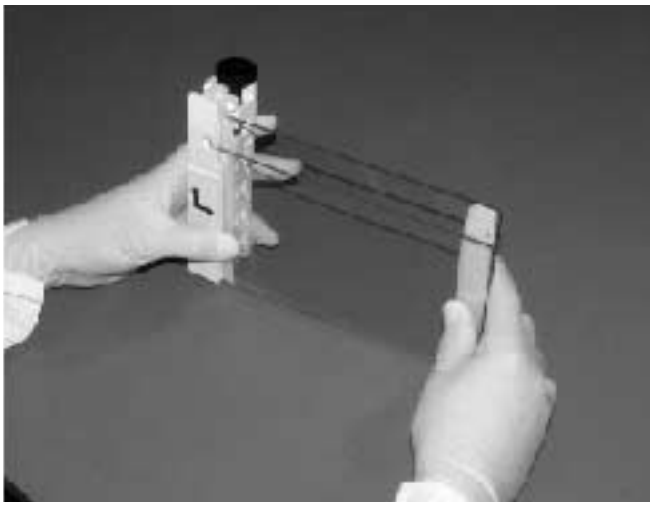


Fig. 4.2

4. サンドイッチクランプをゆるめ、 DCodeアライメントカードをガラスサンドイッチの間に滑り込ませスペーサーの位置を整えます。

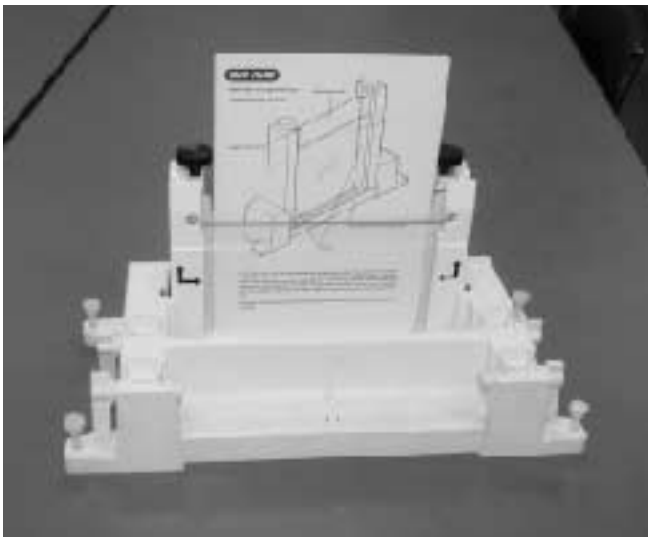


Fig.4.3

5. 左右と下方を揃えクランプ上部の黒いネジを締めます。この時クランプをガラスに対して真っ直ぐ横から押付けるようにセットするようにして下さい。ガラスサンドイッチをキャスティングスタンドから取り出し、ガラスサンドイッチ下方をチェックします。この時､ガラスの底面とスペーサーの高さがそろっていることがポイントです｡指でなぞって確認して下さい。
＊揃っていない場合はもう一度手順4. 5.を繰り返して下さい。（Fig.4.3）

6. 正しくクランプが取り付けられましたら、さらに強くクランプ上部の黒いネジを締めつけて下さい。ここでの締めつけが弱いとゲル溶液が漏れることがあります。

7. 10cmゲルの場合、ガラスサンドイッチの中央に溝や切り込みの入っていない2ウェルコーム用のミドルスペーサーを差し込みます。上部から2ウェルコームを入れガラスサンドイッチに正しくセットされているか確認します。（Fig.4.4）

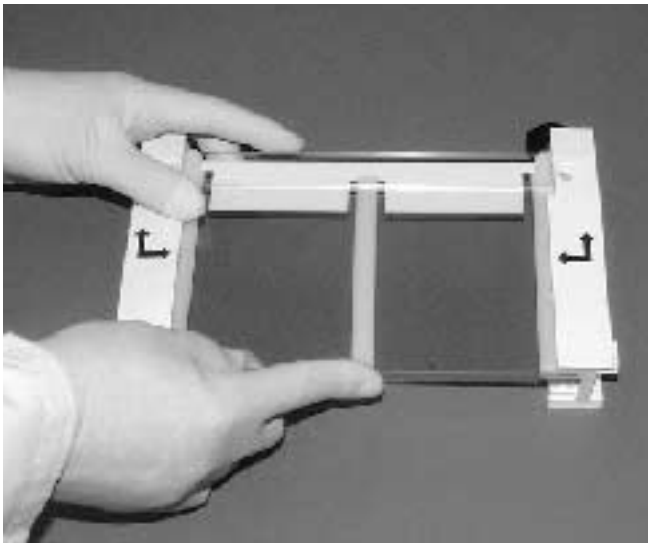


Fig. 4.4

8. コームガスケットの用意をします。コームガスケットの裏側にあるコームガスケットネジをゆるめます。コームガスケットネジにはあらかじめ､ネジの中心に矢印（→）を書き込み回転数の目安とします。（Fig.4.5）

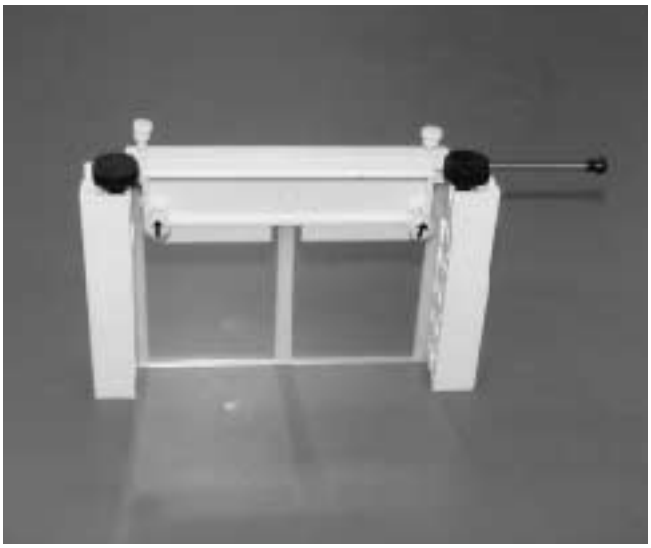


Fig. 4.5

9. コームをセットした状態で再びキャスティングスロットにたてます。コームガスケットの窪みにあうようにコームの上からコームガスケットを注意深く取付けます。ガスケットの部分とスペーサー、ガラスプレートが密着するようにします。（Fig.4.6）

注意：ガスケットにゲルの粒等がついていないこと、ガスケットやスペーサーが歪んだり波打ったりしていないことを確認してください。歪んだり波打ったりしていた場合はスパチュラ等で押付け、セットし直して下さい。

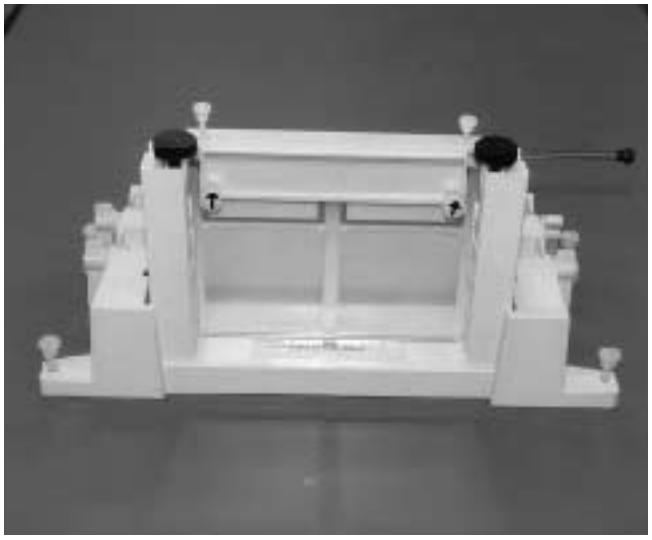


Fig.4.6

10. 正しくセットできましたら、コームガスケットのネジを締めます。まず、ガラスに触れるところまでまわし、更にそれに1/4 回転加えます。

11. プレッシャークランプのネジにもあらかじめ回転数の目印とする→を書き込んでおきます。

12. アジャストメントスロットからコームガスケットのセットされたガラスサンドイッチを取り出し（この時コームガスケットを持たないで下さい。お取扱の際はサンドイッチクランプの部分をお持ち下さい。）コームガスケットのネジが下に向くようにしてプレッシャークランプに乗せます。（Fig.4.7）

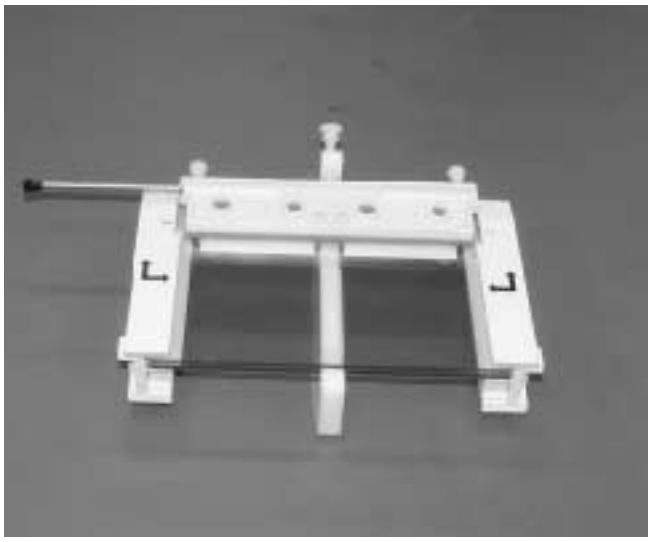


Fig.4.7

13. プレッシャークランプのネジを締めます。プレッシャークランプのネジがコームガスケットに触れるまでまわします。その状態から更に軽く2回転しめます。
（締めすぎますとガラスが割れることがあります。）
（Fig.4.8）

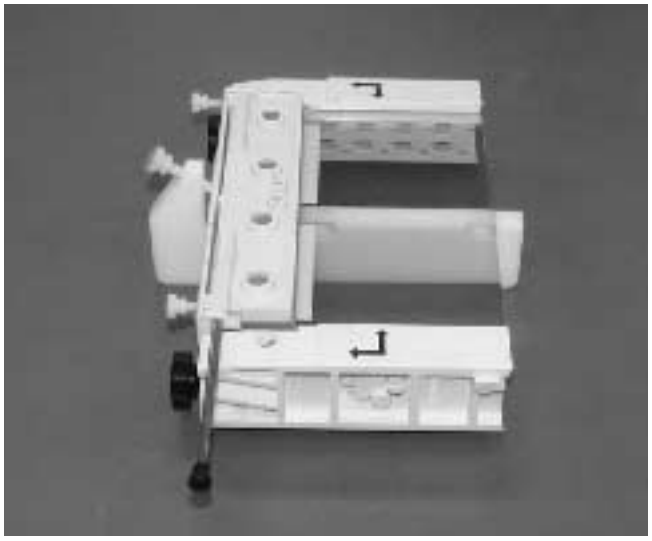


Fig.4.8

14. この状態でコームガスケットのネジを軽く1回転しめます。
（締めすぎますとガラスが割れることがあります。）
（Fig.4.9）

Fig.4.9

15. プレッシャークランプをはずします。

16. コームガスケット上部の両端についている“ Tilt rod ”をとめているネジをゆるめ、“ Tilt rod ”を引き出します。（Fig.4.10）

Fig.4.10

17. 固定用カムのついているキャスティングスタンドに灰色のガスケットを設置します。ガラスサンドイッチを短いガラスプレートが自分の方を向くようにキャスティングスタンドに立てます。キャスティングスタンドについた固定用カムを、ハンドルを上に向けガラスサンドイッチのクランプに押し込みます。両方のカムが押し込まれた状態で両手でカムを持ち、180 ℃回転させてカムのハンドルを下向きにしガラスサンドイッチを固定します。
（Fig.4.11）

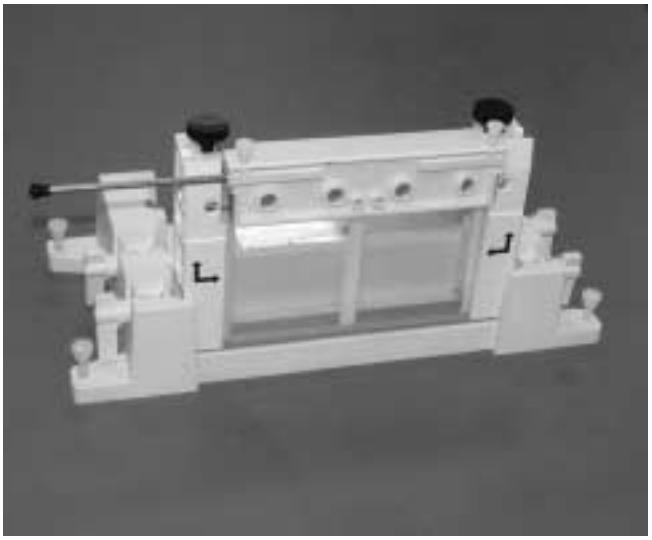


Fig.4.11

18. サンドイッチクランプにインジェクションポート（Oリング付き黒色ネジ）を取付けます。（Fig.4.12）

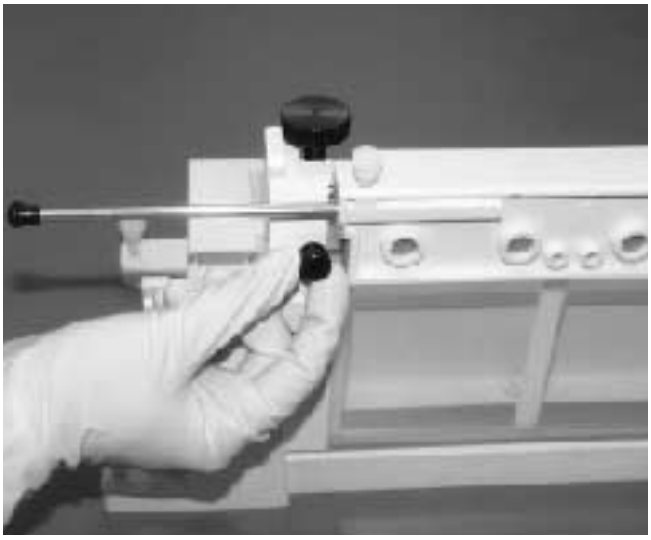


Fig.4.12

19. Tilt rodを引き出し、7.5×10㎝ゲルの場合はTilt rodの奥から2本目のラインに合わせて固定し、キャスティングスタンドに取付けられたガラスサンドイッチを約 20 °に傾けます。
（16×16㎝ゲルの場合は奥から1本目のラインに合わせて固定して下さい。）（Fig.4.13）

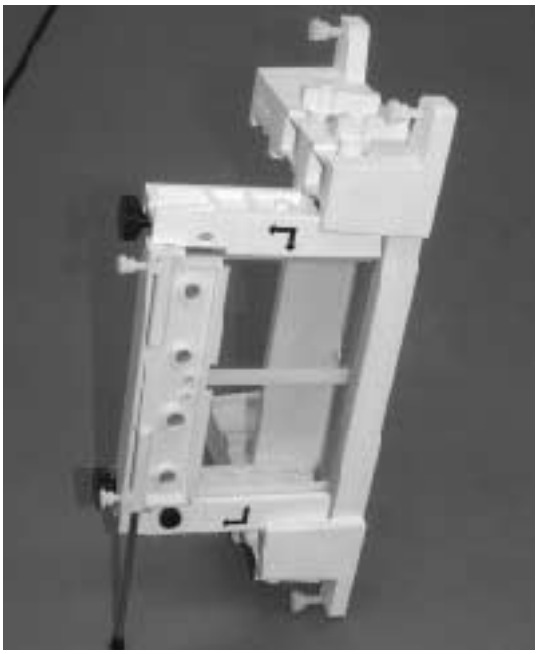


Fig.4.13

20. ゲルを作製しない側のエアーベントポート（コームガスケット中央部についている二つの穴の片側）にエアーベントポートプラグを差し込みます。これによって、ゲル溶液が隣のスペースに入り込むのを防ぎます。（Fig.4.14）

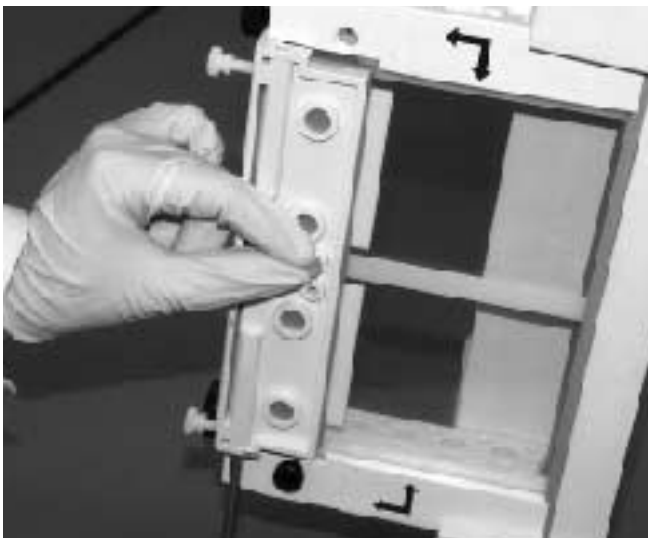
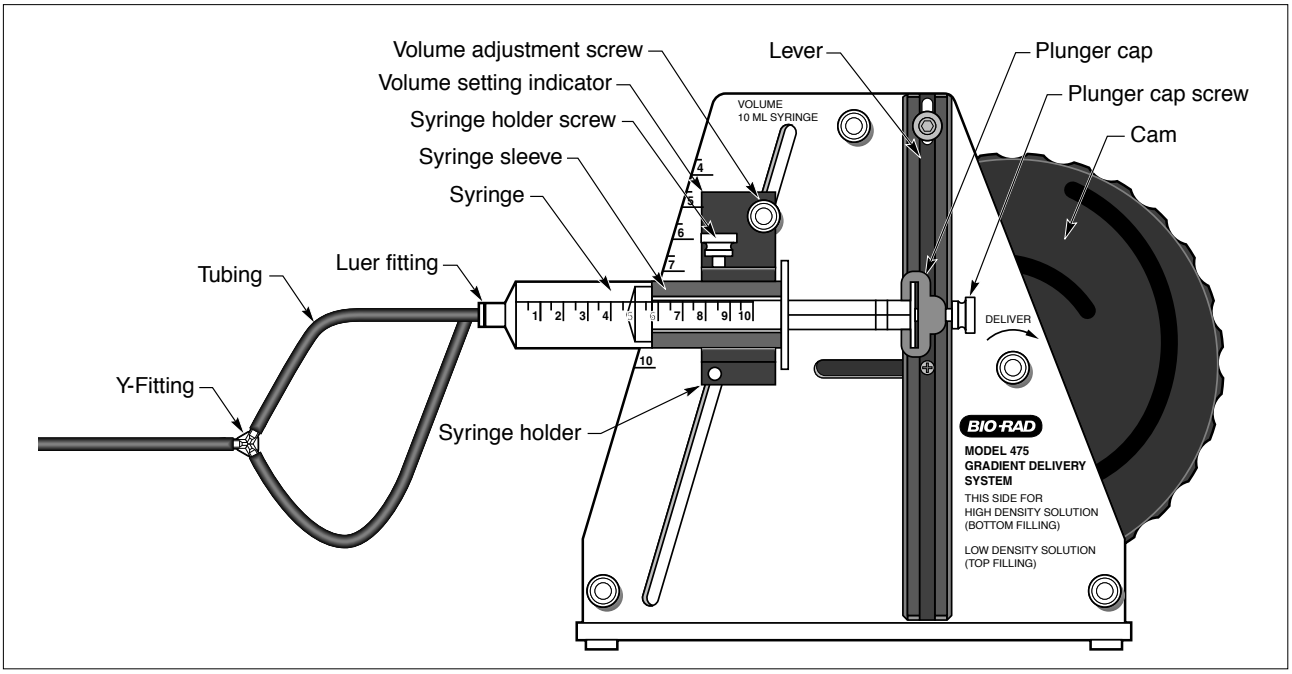


Fig.4.14

21. グラジェントフォーマーのセッティングをします。グラジェントデリバリーシステムを開始できる状態にします。回転用カムを回してレバーを垂直の状態にします。
（回転用カムには遊びがあるので完全に回しておいて下さい）
ボリュームアジャストメントレバーを定位置にします。ボリュームアジャストメントレバーの設定値は、ゲルの大きさ､厚さの違いによる容量との関係によって右のように決定します。

ゲルのサイズ及びアクリルアミド容量とグラジェントフォーマー設定値との関係
（M475グラジェンドデリバリーシステム英文マニュアル参照）

スペーサーサイズ	ゲルサイズ	シリンジ当りのゲル容量	M475 アジャストメントセッティング
0.75mm	7.5×10cm	5ml	3.5
	16×10cm	8ml	6.5
	16×16cm	11ml	9.5
1.00mm	7.5×10cm	6ml	4.5
	16×10cm	11ml	9.5
	16×16cm	16ml	14.5
1.50mm	7.5×10cm	8ml	6.5
	16×10cm	15ml	13.5
	16×16cm	24ml	22.5



22. 付属のチューブを15.5 cmの長さに2本切断し、その先にルアーフィッティングをそれぞれ取付けます。
きれいに洗浄したシリンジに変性剤濃度（HighまたはLow）の目印を付け、シリンジスリーブにシリンジをはめ込み、プランジャーキャップをシリンジのピストンに取り付け、ネジを十分にしめます。その後シリンジに準備したチューブのついたルアーフィッティングをつけます。（フィッティング、チュービング等のパーツにゲルの残り等が付着していないことを確認して下さい。）（Fig.4.15）

Fig. 4.15

23. 緑色のYフィッティングの一方向に9cmに切ったチューブをつけ、ルアーカップリングをチューブの反対側につけます。（Fig.4.16）

Fig. 4.16

24. インジェクションポートに2方コックを差し込みます。Yフィッティングの付いたチューブの端のルアーカップリングを2方コックに差し込みます。

25. 2本のスピッツに変性剤濃度の高いゲル溶液と、低いゲル溶液を必要量準備し、それぞれに10% 過硫酸アンモニウム（0.9%v/v）とTEMEDを0.09%（v/v）を加え混ぜます。高変性剤濃度のものにDye Solutionを加え、グラジェントのかかり方を目で確認できるようにします。（ゲル6 mlに対して100μl程度加えます。）

26. それぞれのシリンジで調整したゲル溶液を素早く吸い取ります。この時スピッツにゲルが残らないように完全に吸い取って下さい。

27. シリンジを逆さにして持ち、軽くたたきながら気泡をすべて抜いて下さい。シリンジを押して空気を押し出す際に、ゲルを押し出してしまわないように気をつけてください。

28. 高濃度変性剤の入ったシリンジは、グラジェントフォーマーの“HIGH DENSITY”側に取付けます。（この場合BOTTOM FILLING）取付け方はプランジャーキャップのネジの部分をレバーに取付け、ボリュームアジャストメントレバーにシリンジスリーブを入れ、ネジで締めます。

注意：シリンジを押してしまうとゲルが出てきてしまいますのでシリンジを押さないように注意してください。（Fig.4.17）

Fig. 4.17

29. 低濃度変性剤の入ったシリンジも同様に、グラジェントフォーマーの“LOW DENSITY”側に取付けます。（この場合BOTTOM FILLING）
(Fig.4.18)

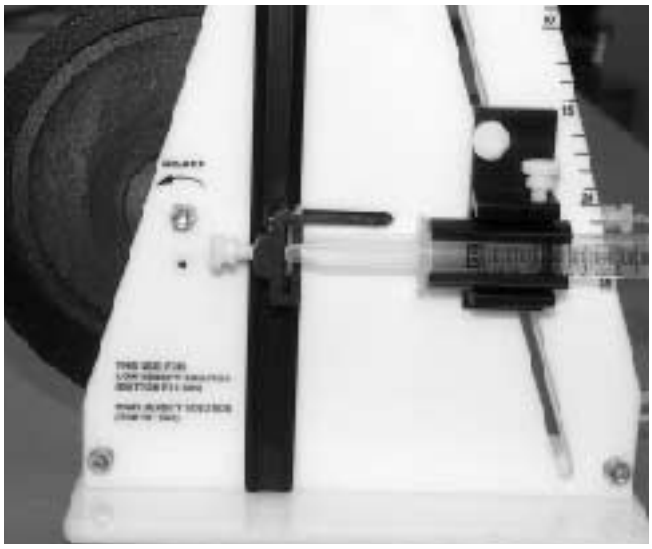


Fig. 4.18

30. シリンジを取付けたらそれぞれのチューブの先をY-フィッティングに接続して下さい。

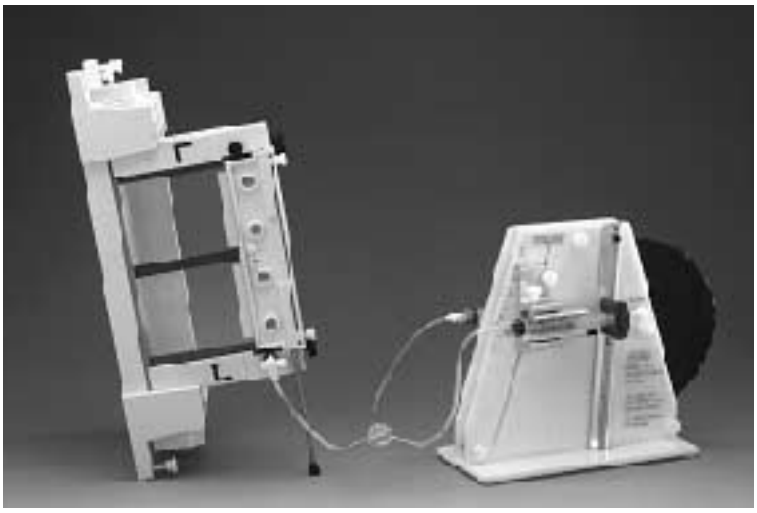


Fig.4.19

31. ゆっくりとグラジェントフォーマーの回転用カムをまわして下さい。徐々にゲルがY-フィッティング、チュービングを通ってガラス下部から注がれます。bottom fillingの場合は無色の低変性剤濃度溶液から入ります。この時必ず途中で回転を止める事なく一定の速さでまわしてください。

32. カムが止まるまで完全にまわしましたら、余分なゲルがエアーベントポートから流出してきます。その後2方コックをしめます。（Fig.4.21）

33. Tilt rodを水平にもどし重合させます。（Fig.4.22）

34. ゲル溶液が固まる前に素早くチュービング及びシリンジを洗浄して下さい。

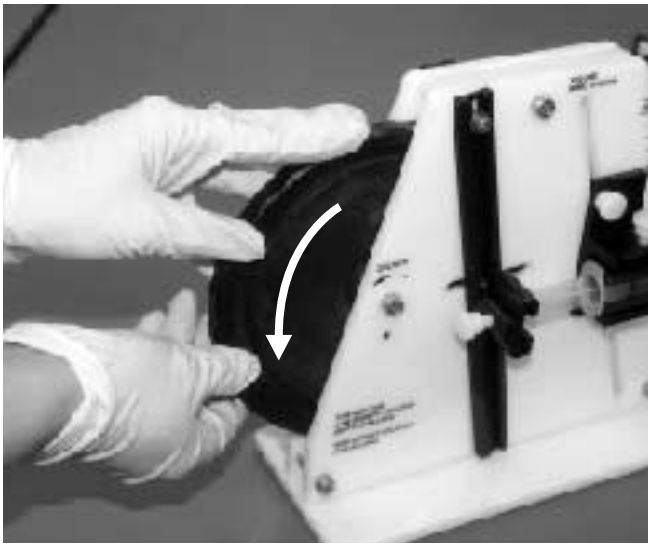


Fig. 4.20

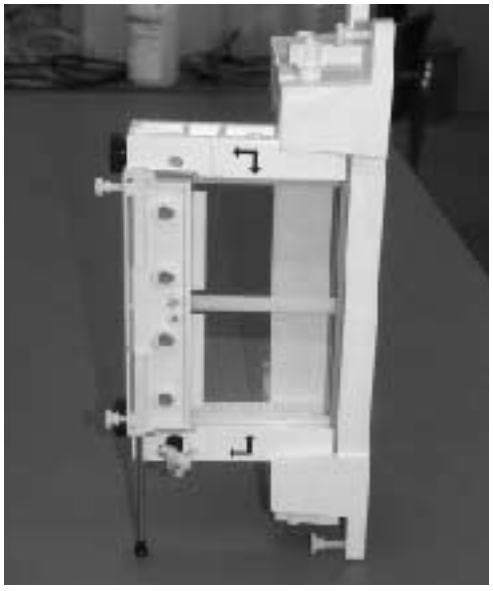


Fig. 4.21

Fig. 4.22

35. 60分ほど重合しましたら、10cmゲルの場合はTilt rodを反対側につけ、もう一方のゲルを同様に作成します。

5．DGGE Parallel Gradient Gelの作製

注意：ガラスプレートサンドイッチを作製する際は、手袋と安全眼鏡を着用して下さい。

1. 7Lの1×TAE を用意し、 DCodeチャンバーの“ Fill ”と“ Run level line ”の間に水面がくるように満たします。DCodeのふたをします。電源を入れヒーターのスイッチを入れます。ヒーターの温度コントローラーの設定を60 ℃（注）にします。この時、バッファー槽の中のインナーコアは取り出しておきます。℃/RRの表示のあるボタンを押し、200 ℃に設定しますと急速に設定温度まで加温し、時間の短縮が可能です。
（温まるまで1～1.5 時間かかります。泳動槽にて加温する前に電子レンジにて予め温めておくことも可能です。）

   再現性の良い泳動を行うためにバッファーの再利用はおすすめ致しません。

   （注）：実際の泳動温度より少し高めにセットしておきます。

2. 十分洗浄し乾燥させたガラス、スペーサーを組み立てます。サイズの長いガラス板を置き、その上の両端にスペーサーをセットします。スペーサーは、（グラジェントゲル用スペーサーの場合）切り込みのある方を外側に（彫り込みのある面を長いガラス板側に）します。その上に短いガラス板をのせ、下段を揃えます。（Fig.5.1）

Fig.5.1

3. 左右のサンドイッチクランプを取り付け、軽くしめます。軽く締めた状態でキャスティングスタンドの固定用カムのないスロットにセットします。（Fig.5.2）

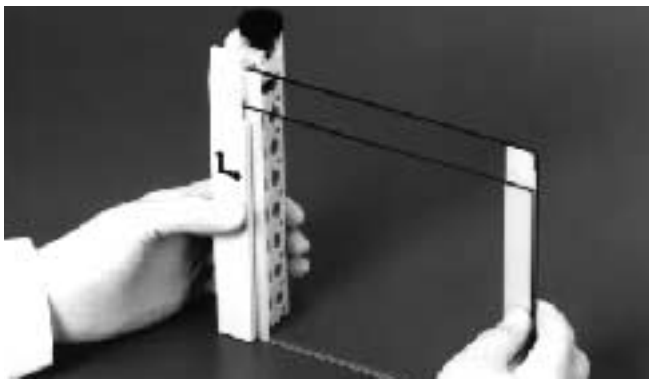


Fig.5.2

4. サンドイッチクランプをゆるめ、 DCodeアライメントカードをガラスサンドイッチの間に滑り込ませスペーサーの位置を整えます。（Fig.5.3）

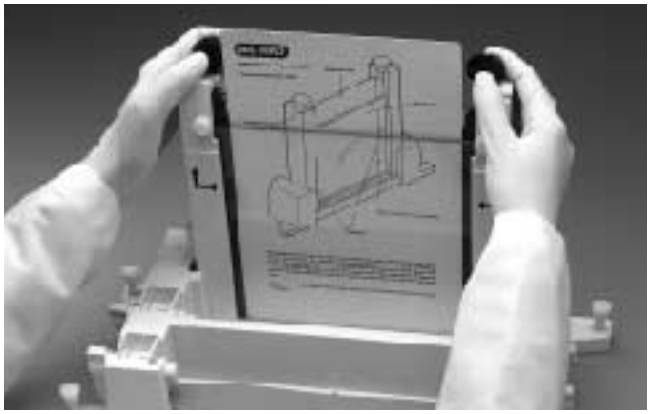


Fig. 5.3

5. 左右と下方を揃えクランプ上部の黒いネジを締めます。この時クランプをガラスに対して真っ直ぐに押付けるようにセットして下さい。ガラスサンドイッチをキャスティングスタンドから取り出し、ガラスサンドイッチ下方（底面）をチェックします。この時､ガラスの底面とスペーサーの高さがそろっていることがポイントです。指でなぞって確認して下さい｡そろっていない場合はもう一度手順4、5を繰り返して下さい。

6. 正しくクランプが取り付けられましたら、クランプ上部の黒いネジをさらに強く締めつけて下さい。ここでの締めつけが弱いとゲル溶液が漏れることがあります。

7. 固定用カムのついているキャスティングスタンドに灰色のガスケットを設置します。ガラスサンドイッチを短いガラスプレートが自分の方を向くようにキャスティングスタンドに立てます。キャスティングスタンドについた固定用カムをハンドルを上に向けガラスサンドイッチのクランプに押し込みます。両方のカムが押し込まれた状態で両手でカムを持ち180°回転させて、カムのハンドルを下向きにしガラスサンドイッチを固定します。

8. グラジェントフォーマーのセッティングをします。グラジェントデリバリーシステムを開始できる状態にします。回転用カムを回してレバーを垂直の状態にします。（回転用カムには遊びがあるので完全に回しておいて下さい）ボリュームアジャストメントレバーを定位置にします。ボリュームアジャストメントレバーの設定値は､ゲルの大きさ､厚さの違いによる容量との関係によって決定します。
右表を参考にして下さい。

スペーサーサイズ	ゲルサイズ	シリンジ当りのゲル容量	M475 アジャストメントセッティング
0.75mm	16×10cm	5ml	6.5
	16×16cm	11ml	9.5
1.00mm	16×10cm	11ml	9.5
	16×16cm	16ml	14.5
1.50mm	16×10cm	15ml	13.5
	16×16cm	24ml	22.5

9. 付属のチューブを15.5cmの長さに2本切断し、その先にルアーフィッティングをそれぞれ取付けます。

10. きれいに洗浄したシリンジに変性剤濃度（HighまたはLow）の目印を付け、シリンジスリーブにシリンジをはめ込み、プランジャーキャップをシリンジのピストンに取り付けネジを十分にしめます。その後、シリンジに9で準備したチューブのついたルアーフィッティングをつけます。（フィッティング、チューブ等のパーツにゲルの残り等が付着していないことを確認して下さい。）

11. 緑色のYフィッティングに9 cmに切ったチューブをつけ、ルアーカップリングをチューブの反対側につけます。

12. 11 のルアーカップリングに19ゲージのニードルを取り付けます。

13. スピッツに変性剤濃度の高いゲル溶液と､低いゲル溶液を必要量準備し、10%過硫酸アンモニウム0.9%（v/v）とTEMEDを0.09%（v/v）となるように加え混ぜます。高変性剤濃度のものにDye Solutionを100ml加えグラジェントのかかり方を目で確認できるようにします。（この色素は、サンプルの泳動には影響しません）

14. それぞれのシリンジについたチューブより13で調整したゲルを素早く吸い取ります。この時スピッツにゲルが残らないように完全に吸い取って下さい。

15. シリンジを逆さにして持ち､軽くたたきながら気泡をすべて抜いて下さい。シリンジを押して空気を押し出す際にゲルを余分に押し出してしまわないように気をつけてください。シリンジ及びチューブ内の気泡を完全に除いて下さい。

16. 高濃度変性剤の入ったシリンジは、グラジェントフォーマーの“ HIGH DENSITY ”側に取付けます。（この場合TOP FILLING） 取付け方はプランジャーキャップのネジの部分をレバーに取付け、ボリュームアジャストメントレバーにシリンジスリーブを入れ､ネジで締めます。

注意：シリンジを押すとゲルが出てきてしまいますので、シリンジを押さないようにして下さい。

17. 低濃度変性剤の入ったシリンジも同様に、グラジェントフォーマーの“ LOW DENSITY ”側に取付けます。（この場合TOP FILLING）

18. シリンジを取付けたらそれぞれのチューブの先をY-フィッティングに接続して下さい。

19. 19ゲージのニードルをあらかじめ7.でセットしたガラスサンドイッチの間に設置します。（必要であればセロテープで固定して下さい）、ゆっくりとグラジェントフォーマーの回転用カムをまわして下さい。徐々にゲルがチュービング、Y-フィッティングを通ってガラス上部から注がれます。TOP FILLINGの場合は着色された高変性剤濃度溶液から入ります。一定の速さでまわして下さい。（Fig.5.4）

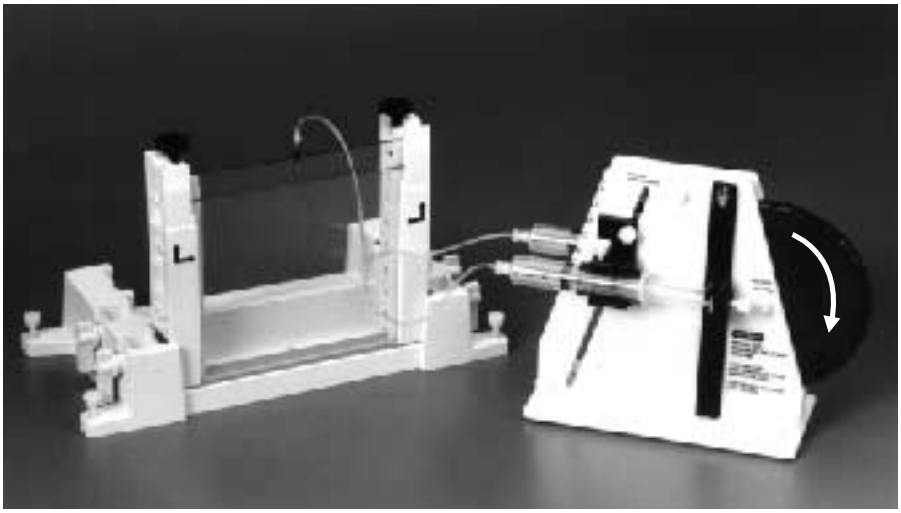


Fig. 5.4

20. カムが完全に止まるまで回します。

21. コームをゆっくりゲルをみださない様、また、空気が入らない様差し込んで下さい。

22. 約60分間重合させて下さい。

6．Constant Denaturant Gelの作製

注意：ガラスプレートサンドイッチを作製する際は、手袋と安全眼鏡を着用して下さい。

1. 7Lの1×TAEを用意し、DCodeチャンバーの“Fill”と“Run level line”の間に水面がくるように満たします。DCodeのふたをします。電源を入れヒーターを入れます。ヒーターの温度コントローラーの温度を60℃（注）にします。バッファー槽の中のインナーコアは取り出しておきます。℃/RR の表示のあるボタンを押し、200 ℃に設定しますと急速に設定温度まで加温し、時間の短縮をすることが可能です。
（温まるまで1～1.5 時間かかります。泳動槽にて加温する前に電子レンジにて予め温めておくことも可能です。）

   再現性の良い泳動を行うためにバッファーの再利用はしないでください。

   （注）：実際の泳動温度より少し高めにセットしておきます。

2. きれいに洗い乾燥させたガラス、スペーサーを組み立てます。サイズの長いガラス板を置き、その上の両端にスペーサーをセットします。スペーサーは、（グラジェントゲル用の場合）切り込みのついている方を外側に（彫り込みのついている方を長いガラス板側に）します。サイズの短いガラス板をのせます。（Fig.6.1）

Fig.6.1

3. 左右のサンドイッチクランプを取り付け、軽くしめます。軽く締めた状態でキャスティングスロット（固定用カムのついていないスロット）にセットします。（Fig.6.2）

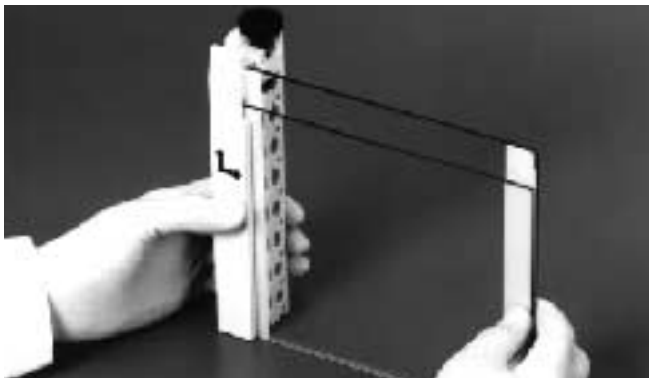


Fig.6.2

4. サンドイッチクランプをゆるめ、DCodeアライメントカードをガラスサンドイッチの間に滑り込ませスペーサーの位置を整えます。（Fig.6.3）

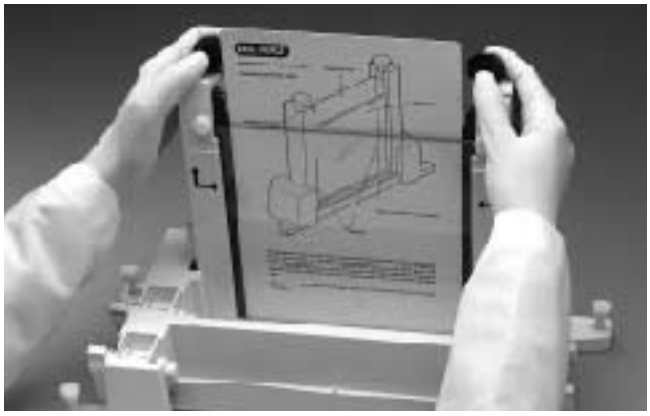


Fig.6.3

5. 左右と下方を揃えクランプ上部の黒いネジを締めます。この時クランプをガラスに対して真っ直ぐに押付けるようにセットするようにして下さい。ガラスサンドイッチをキャスティングスタントから取り出し、ガラスサンドイッチ下方をチェックします。この時､ガラスの底面とスペーサーの高さがそろっていることがポイントです｡指でなぞって確認して下さい｡そろっていない場合はもう一度手順4. 5. を繰り返して下さい。

6. サンドイッチクランプが正しくセットされていましたら、クランプ上部の黒いネジをさらに強く締めつけて下さい。

7. 固定用カムのついているキャスティングスタンドに灰色のガスケットを設置します。ガラスサンドイッチを短いガラスプレートが自分の方を向くようにキャスティングスタンドに立てます。キャスティングスタンドについた固定用カムをハンドルを上に向けガラスサンドイッチのクランプに押し込みます。両方のカムが押し込まれた状態で両手でカムを持ち180 ° 回転させてカムのハンドルを下向きにしガラスサンドイッチを固定します。

8. 均一ゲルを準備します。下表にゲルのサイズと必要な容量について示します。

スペーサーサイズ	16×16cm　ゲル	16×10cm　ゲル
0.75mm	25ml	15ml
1.00mm	30ml	20ml
1.50mm	45ml	26ml

均一ゲルの変性剤濃度はperpendicularゲルで電気泳動した結果に基づきその解離度がもっとも大きい濃度を選択します。濃度の決定法について詳しくは英文取扱説明書 及び 本マニュアルp.3を参照して下さい。

9. 10% 過硫酸アンモニウム（0.9% v/v）とTEMED（0.09%v/v）をよくまぜます。（Fig.6.4）

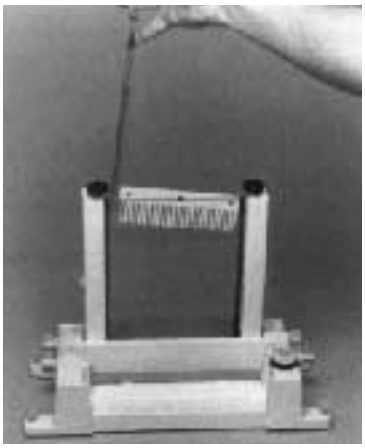


Fig.6.4

10. コームをあらかじめ斜めに差込んでおきます。こうすることによってゲルをいれる際にエアーがトラップされることを防ぎます。

11. ピペットを用いてガラスサンドイッチ内にゲルを流し込みます。ゲルはコームのウェル部分を満たすまで入れて下さい。

12. 約60 分間重合してください。

7．TTGE(Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis)法

TTGEはDGGEの原理を応用していますが、変性剤グラジェントを用いる必要はありません。目的のGeneのmutantとwild typeのDNAを増幅し、一定濃度の尿素を加えたポリアクリルアミドゲルに添加し、電気泳動中に温度を一定速度で上昇させます。
その結果、電気泳動中に経時的に直線的な温度勾配が生じます。
ゲルに加えられた尿素濃度と経過時間中の温度勾配（グラジェント）との組み合わせによって、変性条件が決まります。
すなわち、変性剤グラジェント法を用いずに、スクリーニングが迅速かつ大量に実施可能になります。

DCodeシステムでは、℃/hrで規定される温度勾配（temperature ramp rate）を正確にコントロールすることが可能です。電気泳動する温度範囲と、ramp rateをコントロールすることで、最適な変性条件を設定することが出来ます。TTGEゲルの一例を図7.1に示します。

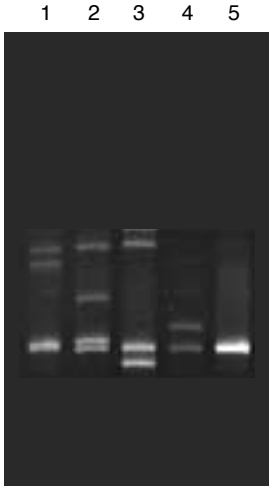


Fig.7.1. Temporal temperature gradient gel. Amplified mutant and wild-type alleles of exon 7 from the cystic fibrosis gene. Separation by TTGE run at 130 V for 5 hours in 1.25x TAE buffer on a 6M urea/6% acrylamide gel (37.5:1) using a temperature range of 50-60 C and a ramp rate of 2 C/hr. Lane 1. mutant allele (1154 ins TC); lane 2.mutant allele (G330X); lane 3. mutant allele (deltaF311); lane 4, mutant allele (R334W); and lane 5, wild-type allele. (Samples courtesy of L. Silverman, Division of Molecular Pathology, University of North Carolina School of Medicine)

8．TTGE泳動条件の決定法

TTGEに用いる温度の範囲を決定するために、弊社のMac MeltのようなDNA Melting Softwareを用いてmelting profileを得る必要があります。検出する部分が最も低いmelting domain中に含まれるように、DGGEと同じ様に一方のPCR primerに30-40bpのGCクランプを付加しなければなりません。
温度グラジェントの範囲（幅）は、GCクランプを付加しないDNA　sequenceを用いて最低と最高のmelting temperatureを測定し、melting profile graphから算出することが可能です(Fig.8.1)。算出された理論的なmelting temperatureは尿素をゲルに加えることによって、下げることが可能です。

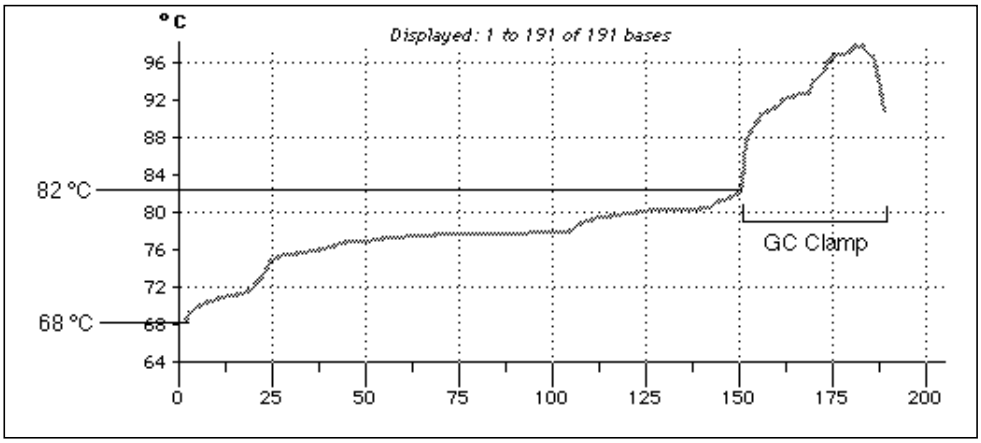
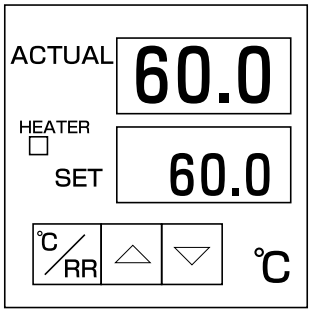


Fig. 8.1

尿素を1M加えることで、melting temperatureは２℃引き下げられます。例えば、Fig8.1では、melting temperatureの幅の理論値は68℃から82℃となりますが、ゲルに尿素7Mを加えることによって、この幅は54-68℃に変化します。TTGEでは6M尿素を用いることが多いのですが、70℃以上のmelt profileが得られた場合にはより高い濃度の尿素を用いるべきです。
ある種のmutationを検出する場合、最終温度を1-2℃高めることによって、分離能が上がることがあります。TTGEゲルでよく用いられる温度は40-70℃です。

試薬の調整
TTGE法で解析を行う場合に必要なすべての電気泳動用試薬はカタログ番号170-9171 TTGE用試薬キットとして販売しております。使用するゲル、バッファー等の組成は英文取扱説明書を参照して下さい。

温度コントローラー
DCodeシステムの温度コントローラーは設定された温度にバッファー温度を保つだけでなく、温度Ramp Rateの設定も行います。温度の実測値及び設定値はコントロールパネルに表示されます。上下キーにより設定値に合わせます。℃/RRボタンは2つのパラメーター表示を切替える際に使用します。



9．TTGE：ゲルの作製

注意：ガラスプレートサンドイッチを作製する際は、手袋と安全眼鏡を着用して下さい。

1. 7Lの泳動バッファーを用意し、 DCodeチャンバーの“ Fill ”と“ Run level line ”の間に水面がくるように満たします。 DCodeのふたをします。電源を入れヒーターをいれます。ヒーターの温度コントローラーの温度設定をします。この時、バッファー槽の中のインナーコアは取り出しておきます。℃/RRの表示のあるボタンを押し、200 ℃に設定しますと急速に設定温度まで加温し、時間の短縮が可能です。
（温まるまで1～1.5 時間かかります。泳動槽で加温する前に電子レンジにて予め温めておくことも可能です。）
再現性の良い泳動を行うためにバッファーの再利用はおすすめ致しません。

2. 十分に洗浄し、乾燥させたガラス、スペーサーを組み立てます。サイズの長いガラス板を置き、その上の両端にスペーサーをセットします。その上に短いガラス板をのせ下段を揃えます。
（Fig.9.1）

Fig.9.1

3. 左右のサンドイッチクランプを取り付け、軽くしめます。軽く締めた状態でキャスティングスロットにセットします。（Fig.9.2）

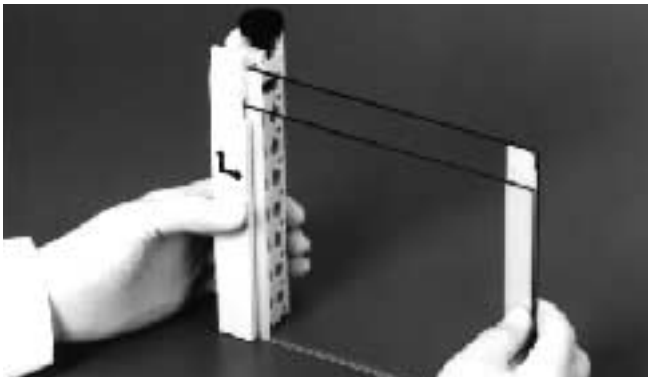


Fig.9.2

4. サンドイッチクランプをゆるめ、 DCodeアライメントカードをガラスサンドイッチの間に滑り込ませスペーサーの位置を整えます。（Fig.9.3）

Fig.9.3

5. 左右と下方を揃えクランプ上部の黒いネジを締めます。この時クランプをガラスに対して真っ直ぐに押付けるようにセットして下さい。ガラスサンドイッチをキャスティングスロットから取り出し、ガラスサンドイッチ下方（底面）をチェックします。この時､ガラスの底面とスペーサーの高さがそろっていることがポイントです。指でなぞって確認して下さい｡そろっていない場合はもう一度手順 4、5を繰り返して下さい。

6. 正しくクランプが取り付けられましたら、クランプ上部の黒いネジをさらに強く締めつけて下さい。

7. 固定用カムのついているキャスティングスタンドに灰色のガスケットを設置します。ガラスサンドイッチを短いガラスプレートが自分の方を向くようにキャスティングスタンドに立てます。正しく設置されましたら、クランプ上部にある黒いネジを上部から押付けながらキャスティングスタンドについた取付け用カムをガラスサンドイッチのクランプに押し込みます。両方のカムが押し込まれた状態で両手でカムを持ち180 ° 回転させてガラスサンドイッチを押しつけます。

8. 50mlのチューブに必要量のゲル溶液を入れます。

スペーサーサイズ	16×16cm　ゲル
0.75mm	25ml
1.00mm	30ml
1.50mm	45ml

9. 必要量0.09% （v/v）のTEMEDと終濃度0.9%（v/v）となるよう10%過硫酸アンモニウムを加え良く混ぜます。

10. コームをあらかじめ斜めに差し込んでおきます。こうすることによってゲルをいれる際にエアーがトラップされることを防ぎます。
（コームは後から差し込んでも構いません。）

11. ピペットを用いてガラスサンドイッチ内にゲルを流し込みます。ゲルはコームのウェル部分を満たすまで入れて下さい。

12. 約60分間重合させます。

10．SSCP(Single-Strand Conformational Polymorphisms)法

一本鎖DNAは塩基配列に依存した高次構造をとるため、塩基配列の違いがその構造の差となり移動度の差として検出されます。SSCPでは変性剤の含まれないポリアクリルアミドゲルで泳動します。wild typeとmutantの二本鎖DNAはまず一本鎖に解離され、その後泳動されます。サンプルの移動度の差のよってミューテーションの有無が検出されます。SSCPはその簡便さゆえに広くミューテーションスクリーニングに用いられている手法です。しかしながら、サンプルのミューテーションに応じた泳動条件は経験的に決定されなければならなく、適切な泳動条件の決定は非常に重要です。検出効率に影響するファクターについて次に示します。

1. DNAフラグメントの長さ：適切な泳動条件下において350bp以下の遺伝子に対する一塩基ミューテションの検出効率は90-95%前後です。DNA鎖がそれ以上長くなるにしたがって効率は落ちます。
2. ゲルの温度：4-25℃の泳動温度でミューテーションによる移動度の差が検出されます。最適な泳動温度は経験的に決定します。
3. ゲル組成：サンプルによっては5-10%のグリセロールを加えることによって効果的に移動度の差を検出できる場合があります。グリセロールは一本鎖DNAの移動度を小さくするため、一般的に室温に近い温度で泳動されます。
4. 架橋度：アクリルアミドとビスの比率は架橋度を決定します。SSCPでは1-2%の架橋度が多く使用されます。アクリルアミドの濃度は5-10%が一般的です。
5. バッファー濃度：ゲルは通常0.5×TBEまたは、1.0×TBEが使用されます。

> DCodeは冷却装置を接続することによって5-25℃で泳動することが可能です。SSCP用のクーリングフィンガー付き泳動槽にタイゴンチューブを取付け、冷却装置と接続します。
> 冷却装置は冷却水を循環させるポンプの内蔵された低温バスサーキュレーターをお勧めします。冷却装置は-20℃程度まで冷却可能なものをお勧めします。

試薬の調整

SSCP法により解析を行う場合に必要な全ての電気泳動用試薬はSSCP用試薬キット（カタログ番号170-9172）として販売しております。

各試薬の調整は英文取扱説明書を参照してください。

泳動バッファーの冷却とチラーについて

1. DCodeシステムでバッファーを冷却する場合、冷却装置が別途必要となります。バッファーを5-20℃で泳動を行なう場合、冷却装置は-20℃にセットされ、冷却装置に内蔵されたポンプによって冷媒を循環させなければなりません。（NESLAB RTE111、RTE-211、RTE-221等を冷却装置としてお勧めしています）
2. 冷却装置の冷媒用タンクに50%のエチレングリコールを入れます。（50%以上のエチレングリコールは冷却効率を下げます。冷却装置の取扱方法に従って下さい）
3. DCodeクーリングフィンガー付きタンクに泳動バッファー7Lを満たして下さい。（より良い再現性を得るために、バッファーの再利用はしないで下さい。）
4. 二本のタイゴンチューブを外付けのチラーに取り付けます。タイゴンチューブのもう一端をクイックリリースコネクターにつけます。
5. クーリングタンクの背面のクーリングフィンガーにタイゴンチューブのついたクイックリリースコネクターをつけます。チラーのスイッチを入れ、最大の冷却効率を得るために-20℃にセットします。しかし、50%エチレングリコールで設定値まで下がらない機器もあるため、冷却装置の取扱説明書を参照下さい。DCodeの泳動槽には温度コントロールモジュールをセットして下さい。また、透明のローディング用蓋も取り付けておいて下さい。（20～25℃で電気泳動を行なう場合は冷却装置を-5-0℃に設定して下さい。）
6. パワーコードを取り付けます。電源を入れ、ポンプとヒーターを入れます。温度コントローラーは泳動温度に設定し、温度Ramp Rateは200℃/hrにします。これによってバッファーは設定温度に到達します。
7. 設定温度になるようにバッファーをあらかじめ冷却しておく必要があります。5-10℃まで冷却するには1-1.5時間かかります。オーバーナイトであらかじめ冷却しておくと時間の節約になります。

11．SSCP：ゲルの作製

ゲルサンドイッチ作製等の手順はTTGE操作手順を参照して下さい。（本マニュアルP.15）

12． 電気泳動準備について（DBGE.CDGE.TTGE.SSCP）法

上部バッファー槽の取り付け

1. **インナーコアを水平に置き、その上においたU字型のガスケットが平らな面のコアに密着するように正しくセットされていることと、使用後のゲルなど粒子状のものが付着していないことを確認します。これらは漏れの原因になります。**

2. **ゲルが重合された後、キャスティングスタンドのカムシャフトを180度回転させて外側に引き、ゲルサンドイッチを取り出します。サンドイッチからコームを取り除きます。注：サンプルをアプライする時に、ウェルが見やすいようにウェルの部分に印をつけておきます。**

3. **インナープレートをセントラルクーリングコアに接する方向に向け（サンドイッチクランプの矢印（↑→）はセントラルクーリングコアの方へ向けます）、サンドイッチクランプ上部の外側の溝をセントラルクーリングコアのLocating pinにスライドし、フィットさせます。ゲルサンドイッチを水平面より約30度に傾け、さしこみます。そしてサンドイッチクランプのタブをセントラルクーリングコアのラッチにもたせかけます。**

4. **セントラルクーリングコアのラッチの下に指を入れ、親指をサンドイッチクランプの上に乗せ、ゲルサンドイッチをセントラルクーリングコアの方にゆっくりと押しつけワンタッチで固定します（Fig.12.1）。この時カチッという音が聞こえるはずです。短い短いガラスプレートの上部の端がU字型のガスケットのnotchに設置されていなければなりません。**

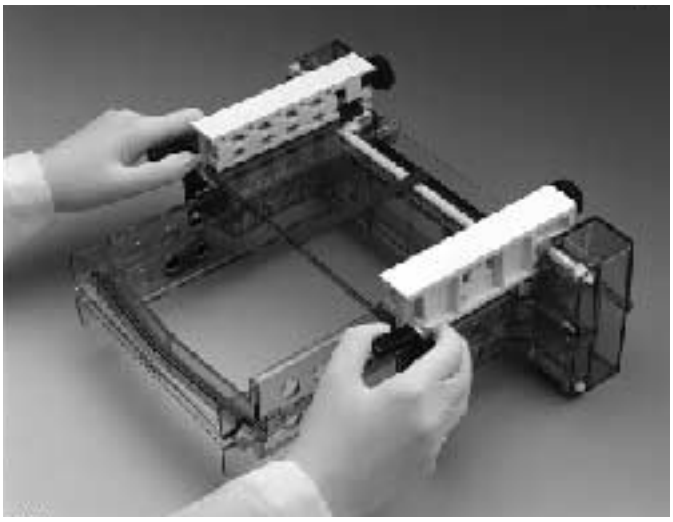
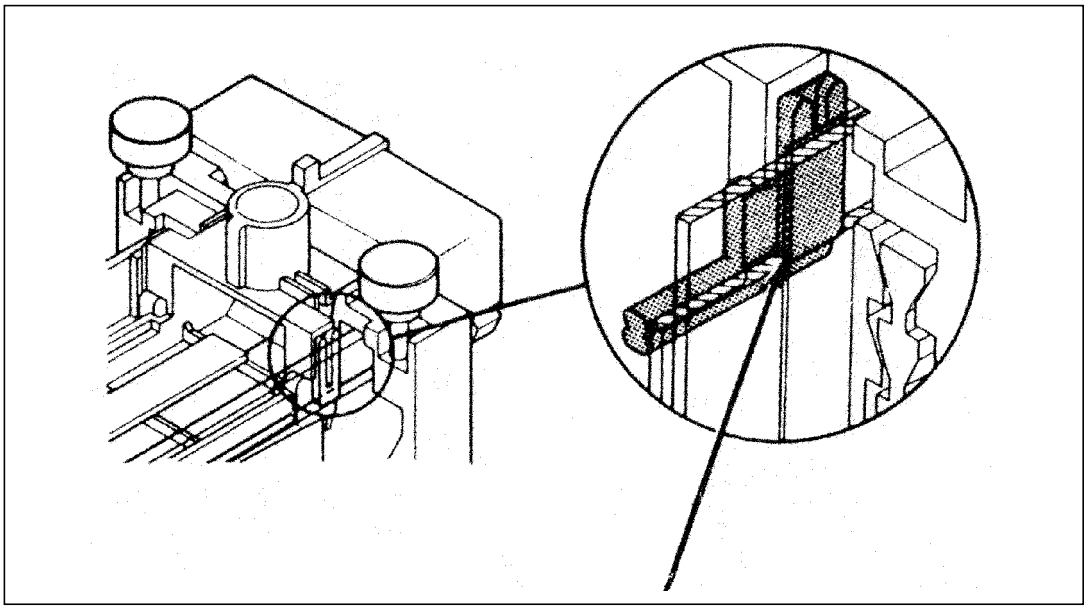


Fig.12.1

5. コアを裏返し、別のゲルサンドイッチを取り付けるため上記の1-4を繰り返して下さい。

注：ガラスプレートとガスケットの密着は非常に重要です。クーリングコア用ガスケットとガラスプレートとの間にすき間があると、そこから泳動バッファーがリークします。サンプルをアプライする前にセントラルクーリングコアにゲルを装着してできた上部バッファー槽にバッファーを満たしてリークの有無を確認して下さい。



6. ゲルを片面のみで泳動する際はインナーコアの片側にゲルサンドイッチ、もう一方にダミーとしてスペーサーの入っていないガラスサンドイッチ（アウターガラス板、インナーガラス板各１枚をサンドイッチクランプでセットしたもの）をセットして下さい。両面にサンドイッチをセットしたインナーコアを立てます。

7. 上部バッファー槽に泳動バッファー350mlを入れます。この時点で上部バッファーシールが完全な状態であることを確認します。もしバッファーが漏れている場合、バッファーをビーカーにとり、ゲルサンドイッチを外し（8.4参照）ガスケットをぬらした後上述のステップ1.-4.を繰り返します。

DGGE,CDGE,SSCPゲル

1. あらかじめ入れておいた泳動バッファーが目的の温度になった時点で、スイッチを切り電源コードを外します。

2. 温度コントロールモジュールを外し、DCode lid standに乗せます。ゲルサンドイッチを取り付けたコアをバッファー槽に入れます。バイオ・ラッドのロゴが入っている方を正面にし、コアを赤いボタンが向かって右側に、黒いボタンが左側にくるように入れます。

   注：コアは一方向にしか入らず、固定されるようになっています。

   温度コントロールモジュールを泳動槽の上に取り付けます。この時、温度コントロールモジュールのStirrerがバッファー槽底の白色プラスチックの穴に入るようにセットして下さい。

3. コードをつなぎ電源、ポンプ、ヒーターのスイッチを入れます。温度コントロール上部の透明のローディングリッドを取り外し、非重合ゲル、あるいはウェルから生じた変性物等を除くため、泳動バッファーでウェルを洗浄します。泳動槽のmaxの線までバッファーが満たされない場合は、バッファーを追加します。透明のloading lidを温度コントロールモジュールの上に戻します。

4. サンプルをアプライする前に設定した開始温度に合わせます。10分から15分を要します。

TTGEゲル

1. あらかじめ入れておいた泳動バッファーが目的の温度になった時点で、スイッチを切り電源コードを外します。

2. 温度コントロールモジュールを外し、DCode lid standに乗せます。ゲルサンドイッチを取り付けたコアをバッファー槽に入れます。バイオ・ラッドのロゴが入っている方を正面にし、コアを赤いボタンが向かって右側に、黒いボタンが左側にくるように入れます。

   注：コアは一方向にしか入らず、固定されるようになっています。
   この時、温度コントロールモジュールを泳動槽の上に取り付けます。

3. コードをつなぎ電源、ポンプ、ヒーターのスイッチを入れます。温度コントロール上部の透明のローディングリッドを取り外し、非重合ゲル、あるいはウェルから生じた変性物等を除くため、泳動バッファーでウェルを洗浄します。泳動槽のmaxの線までバッファーが満たされない場合は、バッファーを追加します。透明のloading lidを温度コントロールモジュールの上に戻します。

4. サンプルをアプライする前に設定した開始温度に合わせます。10分から15分を要します。

5. 設定温度に到達した時、℃/RPボタンと矢印ボタンでramp rateを選びます。サンプルをアプライする前に低めのramp rateで5-10分平衡化します。温度を見る場合には℃/RPボタンを再度押します。

Heteroduplex, CSGE, PTTゲル

1. 泳動用タンクには泳動バッファーを少なくとも２L入れます。

2. 温度コントロールモジュールを外しDCode lid standに乗せます。コアと取り付けたガラスアッセンブリーを、赤いボタンが右側に、黒いボタンが左側にくるように泳動槽に取り付けます。温度コントロールモジュールを泳動槽に設置します。注：コアは一方向にしか入らず、固定されるようになっています。

８．２サンプル添加

1. 透明なloading lidを取り外し、ウェル内の重合していないゲルや変性物質を除くため、ウェルを泳動バッファーで洗浄します。
2. サンプルをピペットマンとsequencing loading tipを用いて添加します。サンプルを添加している間ウェルを損傷しないように注意して下さい。
3. 透明なloading lidを温度コントロールモジュール上に取り付けます。

８．２泳動

泳動用の端子を適当な泳動用電源につなぎます。推奨電源として弊社Power Pac300あるいは3000を推奨致します。

13．泳動について

◇DGGE/CDGEの泳動

1. サンプルをアプライする前に、システムが泳動温度に達していることを確認します。 10-15分かかります。
2. バッファーでウェル内を十分に洗浄し、サンプルをアプライします。

＊ゲルは通常130V前後で泳動します。（発熱による影響を防ぐため180Vを超えないように注意して下さい。）

◇TTGEの泳動

1. 電源にケーブルを差し込みます。バイオ・ラッド社製パワーパック1000、300、または3000をお勧めします。
   ＊ゲルは通常130V前後で泳動します。
   注意：TTGEの場合電圧値は150Vを超えないように注意して下さい。温度勾配に発熱による影響が出るためです。

2. 設定温度に達しましたら℃/RRボタンを押し、Ramp Rateを選択します。℃/RRボタンを押し上下キーを用いて温度設定値を終了温度に合わせ泳動を開始します。TTGEの場合は温度Ramp Rateによって泳動時間は決定されます。泳動条件については前項を参照して下さい。

◇SSCPの泳動

1. サンプルをアプライする前に、システムが泳動温度に保たれていることを確認します。10-15分かかります。
2. ウェル内をバッファーで洗浄し、サンプルをアプライします。

   SSCP法の場合は温度の上昇をさけるため温度コントローラー付き蓋を付けた状態で蓋のオープンリッドのみを取り外してアプライすることをお勧めします。

3. 電源にケーブルを差し込みます。SSCPは定電力で泳動するためバイオ・ラッド社製パワーパック1000、または3000をお勧めします。
   サンプルローディングダイがゲルの中に入ったことを確認し、ポンプを循環させて下さい。その際、パワーパック（バイオ・ラッド社製）が電流の変化を感知し、エラー表示を出す場合がありますが、その場合はポンプを動かしたままパワーサプライを出力させて下さい。

14．ゲルの取り外し

1. 泳動が終了したら、パワーサプライの電源を切ります。

2. パワーサプライから赤黒ケーブルを抜き、温度コントロールモジュールのホルダーを戻します。

3. 温度コントロールモジュールを取り外し、DCode lid standに載せます。

4. 注意深くゲルサンドイッチが取り付けられたコアを電気泳動槽から取り出し、上部バッファーを捨てます。

5. 人差し指をサンドイッチクランプの下に入れ、親指をコアのラッチの上に置きます。親指でラッチを下方に押さえ、ゲルサンドイッチをコアのラッチからはずします。（Fig.14.1）

6. ゲルサンドイッチをコア上部のピンから抜きます。

7. サンドイッチクランプのネジを緩め、サンドイッチクランプからゲルサンドを外します。

8. スパーテルをガラスサンドイッチの間に差し込みます。（Fig.14.2）

9. スパーテルをねじり短いガラスプレートとゲルの間に慎重に空気を徐々に入れていきます。

10. 短いガラスプレートとゲルが完全に離れたら、短いガラスプレートを取り除きます。

11. 次の染色の操作に移します。

Fig.14.1

Fig.14.2

15．検出法について

◇DGGE/CDGE、TTGEゲルの検出

1. ガラスプレートからゲルをはがします。
2. EtBr溶液(250ml泳動バッファー＋10mg/ml EtBr溶液25μl)等で5-15分染色します。
3. 泳動バッファーで5-20分脱色します。
4. ポラロイド写真（フォトゲルドキュメンテーションシステム）、又はイメージ解析装置にて解析します。

◇SSCPゲルの検出

1. ガラスプレートからゲルをはがします。もしRI標識されたサンプルを用いる場合は5の手順を参照して下さい。（RIを用いる際は取扱いに十分注意して下さい。）
2. Radiant red stain (バイオ・ラッド　カタログ番号170-3122)やSYBR GreenⅡ（Molecular Probes Inc.）を泳動バッファーで任意の濃度に希釈し、ゲルを浸し約30分染色します。
3. 染色が終了しましたら、ゲルを250ml程度の泳動バッファーに注意深く移します。必要であれば脱色をします。
4. UVトランスイルミネーターにのせ、ポラロイド写真にて撮影、画像解析装置にて解析します。
5. RI標識されたサンプルを泳動したゲルは、オートラジオグラフィーまたはイメージングスクリーンに露光し、画像解析装置にて解析します。

16．トラブルシューティング

症　　状	原　　因	解　決　策
電源が入らない	ヒューズが切れている	パワーコード接続部分周辺にあるヒューズボックスを確認して下さい
バッファーが循環しない	バッファーの量が少ない	バッファーはFILLレベル以上になるまで入れて下さい
	ポンプが動いていない	BioRadに連絡して下さい
バッファーが温まらない	バッファーの量が少ない	バッファーはFILLレベル以上になるまで入れて下さい
バッファーが温まりにくい (時間がかかる)	上部のサンプルアプライ用の蓋がついていない	上部のサンプルアプライ用の蓋をつけて下さい
攪拌棒が動かない	攪拌棒のベルトが切れている	付属のO-リングを付け替えて下さい
	攪拌棒が正しく固定されていない	泳動槽の底の穴に攪拌棒を入れ、固定して下さい
ゲル調製		
ゲル作成時にゲルがもれる	ゲルサンドイッチが正しく組み立てられていない	ゲルを入れる前にアライメントカードを用いて底面、スペーサー等を揃えて下さい
	ガラス板が欠けている	ガラス板にひびが入っていたり欠けていないことを確認して下さい
(DGGEのみ)		
ガラス板が割れる	コームガスケットの取付け方が強すぎる	コームガスケットのネジがガラス板に軽く触れてから1回転弱閉めて下さい
ゲルが漏れる	プレッシャークランプの締め付けが緩い	プレッシャークランプはコームガスケットに触れてから2回転加えます
	キャスティングスタンドのガスケットが正しくおかれていない	ガラスサンドイッチの底に密着しているか確認して下さい
	コームガスケットが正しく取り付けられていない	正しいコームガスケットを、歪みなく取り付けて下さい
	ガラス板のずれ	サンドイッチクランプの締め付けが緩いとプレッシャークランプを取り付けた際にガラス板がずれることがあります。
	スペーサーの向きが違う	サンドイッチクランプの上部の穴からスペーサーの穴が見えるようにセットして下さい
	パーツの汚れ	パーツに付着したゲルの粒等は完全に洗い流して下さい
	スペーサーやコームの厚さが異なっている	厚さの確認をして下さい
	ストップコックが正しく取り付けられていない	インレットフィッティングにストップコックをしっかりと取り付けて下さい
	ガラス板が欠けている	ヒビやキズのないものを使用して下さい

BIO-RAD 日本バイオ・ラッド　ラボラトリーズ株式会社

ラボプロダクト ディビジョン	本　　社	〒116-0014	東京都荒川区東日暮里5-7-18 コスモパークビル	☎(03)5811-6270 FAX.(03)5811-6272
	神奈川営業所	〒222-0033	横浜市港北区新横浜2-7-3 フジビル	☎(045)476-0351 FAX.(045)476-0350
	つくば営業所	〒305-0031	つくば市吾妻1-15-1 筑波司法会館	☎(0298)52-0835 FAX.(0298)52-0829
	大阪営業所	〒532-0025	大阪市淀川区新北野1-14-11 第一生命ビル	☎(06)6308-6568 FAX.(06)6308-3064
	名古屋営業所	〒465-0093	名古屋市名東区一社3-121-1 MIDORIビル	☎(052)702-2358 FAX.(052)702-2812
	福岡営業所	〒812-0013	福岡市博多区博多駅東2-17-5 モリメンビル	☎(092)475-4856 FAX.(092)475-4858
			※技術的お問い合わせは	☎(03)5811-6271 FAX.(03)5811-6272

M3119-9905